

**EVALUACIÓN DE LAS AGUAS RESIDUALES DOMÉSTICAS DE LA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE COMO MEDIO DE CULTIVO  
NATURAL PARA LA MICROALGA NATIVA *CHLORELLA SP.* Y  
SIMULTANEAMENTE SU CAPACIDAD PARA REMOVER NITRATO Y DQO DE  
DICHAS AGUAS**

**JHONATAN VIVEROS SANTAFE**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE OCCIDENTE  
FACULTAD DE INGENIERIA  
DEPARTAMENTO DE ENERGETICA Y MECANICA  
PROGRAMA DE INGENIERIA AMBIENTAL  
SANTIAGO DE CALI  
2014**

**EVALUACION DE LAS AGUAS RESIDUALES DOMESTICAS DE LA  
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE OCCIDENTE COMO MEDIO DE CULTIVO  
NATURAL PARA LA MICROALGA NATIVA *CHLORELLA SP.* Y  
SIMULTANEAMENTE SU CAPACIDAD PARA REMOVER NITRATO Y DQO DE  
DICHAS AGUAS**

**JHONATAN VIVEROS SANTAFE**

**Proyecto de grado para optar por el título de  
Ingeniero Ambiental**

**Directora  
LUZ MARINA FLOREZ PARDO  
Ingeniera Química, Dr. Sci.**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE OCCIDENTE  
FACULTAD DE INGENIERIA  
DEPARTAMENTO DE ENERGETICA Y MECANICA  
PROGRAMA DE INGENIERIA AMBIENTAL  
SANTIAGO DE CALI  
2014**

**Nota de aceptación:**

**Aprobado por el Comité de Grado en  
cumplimiento de los requisitos exigidos  
por la Universidad Autónoma de  
Occidente para optar al título de  
Ingeniero Ambiental**

**PAOLA ANDREA NEUTA ARCINIEGAS**  
**Jurado**

**Santiago de Cali, 23 de Octubre de 2014**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco muy especialmente a mis padres quienes gracias a su apoyo, comprensión y paciencia me permitieron culminar mis estudios de pregrado.

Agradezco de todo corazón a mi novia Laura V. Arenas por motivarme e impulsarme para entrar en el área de la investigación, además de haberme inculcado el espíritu de la curiosidad y perseverancia.

A mi directora, Luz Marina Flórez, por su guía y acompañamiento. De igual forma al Grupo Interinstitucional de Investigación en Biocombustibles por su asesoría y excepcional disposición de trabajo.

A mi director de programa, el ingeniero Mario A. Gandini, por creer en mis capacidades como estudiante para sacar adelante el presente trabajo y su apoyo en la gestión de los diferentes implementos requeridos.

A los asistentes de laboratorio de la Universidad Autónoma de Occidente, Javier Jurado y William Correa, por su incondicional apoyo y excelente disposición de trabajo en los diferentes análisis y ensayos.

Por último pero no menos importante, a la Universidad Autónoma de Occidente por poner a disposición los recursos necesarios para la culminación del presente trabajo.

## **CONTENIDO**

	<b>pág.</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>11</b>
<b>1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>14</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>17</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
<b>3.1. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>20</b>
<b>3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>20</b>
<b>4. MARCOS DE REFERENCIA</b>	<b>21</b>
<b>4.1. ESTADO DEL ARTE</b>	<b>21</b>
<b>4.2. MARCO TEORICO</b>	<b>27</b>
<b>4.2.1. Generalidades de las microalgas</b>	<b>27</b>
<b>4.2.2. Sistema de cultivo</b>	<b>28</b>
<b>4.2.3. Formas de cultivo</b>	<b>29</b>
<b>4.2.4. Sustancias inhibitorias en el crecimiento de las microalgas</b>	<b>30</b>
<b>4.2.5. Métodos de medición e biomasa y crecimiento</b>	<b>31</b>
<b>5. METODOLOGÍA</b>	<b>34</b>
<b>5.1. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>34</b>
<b>5.1.1. Material biológico y condiciones de cultivo</b>	<b>34</b>
<b>5.1.2. Determinación de biomasa y otros parámetros</b>	<b>36</b>

5.1.3. Selección del medio de cultivo estándar	38
5.1.4. Ensayo con agua residual	39
5.1.5. Ensayo de remoción y crecimiento	40
5.1.6. Ensayo con adición de carbono	41
 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	 43
6.1. CURVA DE CALIBRACIÓN	43
6.2. SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO ESTANDAR	43
6.3. CRECIMIENTO EN EL AGUA RESIDUAL DOMÉSTICA	46
6.4. EVALUACIÓN EN LA REMOCIÓN DE NITRATO Y DQO	51
6.5. EVALUACIÓN EN LA PRODUCCION DE BIOMASA CON ADICION DE CARBONO	 52
7. CONCLUSIONES	56
8. RECOMENDACIONES	58
BIBLIOGRAFIA	60

## LISTA DE CUADROS

	pág.
<b>Cuadro 1 Tasas de crecimiento de <i>Chlorella sp</i></b>	<b>24</b>
<b>Cuadro 2 Eficiencias de remoción de Nitrógeno y DQO por parte de <i>Chlorella sp</i></b>	<b>25</b>
<b>Cuadro 3 Parámetros y métodos utilizados en la caracterización del agua residual domestica</b>	<b>39</b>
<b>Cuadro 4 Resumen datos de crecimiento medios sintéticos</b>	<b>44</b>
<b>Cuadro 5 Composición de los Medios Basal de Bold y Sorokin &amp; Krauss</b>	<b>45</b>
<b>Cuadro 6 Caracterización del agua residual doméstica de la UAO</b>	<b>48</b>
<b>Cuadro 7 Resumen datos de crecimiento en el agua residual</b>	<b>49</b>
<b>Cuadro8 Remoción de Nitrato y DQO por parte de la microalga <i>Chlorella sp.</i></b>	<b>52</b>

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1 Medición iluminancia	35
Figura 2 Cepa empleada y cultivo madre	35
Figura 3 Equipos empleados en el cultivo de la microalga	36
Figura 4 Metodología y equipos empleados para la determinación de biomasa	37
Figura 5 Equipos empleados para la caracterización del agua residual	38
Figura 6 Cultivos con los medios BBM y S&K	38
Figura 7 Cultivos en el agua residual doméstica	40
Figura 8 Fotobioreactores en lote con agua residual doméstica	41
Figura 9 Cultivos de <i>Chlorella</i> sp con adición de carbono inorgánico y orgánico	42
Figura 10 Curva de calibración de biomasa de <i>Chlorella</i> sp en agua des ionizada	43
Figura 11 Evolución de la biomasa en los medios sintéticos	44
Figura 12 Evolución de la biomasa en el agua residual doméstica	49
Figura 13 Crecimiento de <i>Chlorella</i> sp en los diferentes medios de cultivo estudiados	50
Figura 14 Evolución de la biomasa en BBM enriquecido con carbono	54



## RESUMEN

El agotamiento de los combustibles fósiles, los múltiples inconvenientes que ha traído su utilización como principal fuente de energía, el cambio climático, la contaminación de las aguas superficiales, entre otros, son los problemas que han impulsado el uso e investigación de fuentes sustentables de energía, la investigación y el desarrollo de procesos más amigables con el medio ambiente. En este orden de ideas, son requeridas soluciones integrales para mitigar los diversos impactos ambientales que han ocasionado las problemáticas anteriormente expuestas.

El cultivo de microalgas es una actividad que se ha desarrollado durante años en diferentes países, debido a su capacidad de asimilar compuestos inorgánicos y transformarlos en compuestos de gran interés como proteínas y lípidos, entre muchos otros. Su estructura simple y alta productividad los ponen muy por encima de los cultivos terrestres de plantas. La última tendencia en investigación de dichos microorganismos es su empleo como biorremediación de aguas residuales y la integración de este proceso con la producción de biocombustibles.

El presente proyecto evaluó el crecimiento de la microalga nativa *Chlorella sp.* en fotobioreactores agitados por burbujeo a una temperatura de 25 °C, en los que se introdujo un volumen de 350 mL de agua residual doméstica proveniente de la Universidad Autónoma de Occidente. Se realizaron dos tratamientos a dicha agua: autoclavarla y filtrarla y solamente autoclavarla, tomando como patrón de comparación el crecimiento en dos medios sintéticos formulados para dicha cepa bajo las mismas condiciones. Estos medios fueron el Medio Basal de Bold (BBM) y el Medio Sorokin & Krauss (S&K). Dichos experimentos fueron llevados a cabo por triplicado. Adicionalmente se evaluó la remoción de nitrato y DQO en fotobioreactores agitados por burbujeo a 25 °C con la microalga y 900 mL del agua residual por duplicado en relación con un reactor sin la microalga en las mismas condiciones. Finalmente para evaluar si el carbono fue un factor limitante en el ensayo con los medios sintéticos se realizó el cultivo de la microalga en el BBM enriquecido con dos concentraciones de carbonato de sodio y glucosa (0,1 y 0,5 g/L), por duplicado, teniendo adicionalmente un cultivo con el BBM utilizado como patrón.

Los resultados demostraron que la microalga presenta un mejor crecimiento en el agua residual doméstica que en los medios sintéticos, presentando tasas de crecimiento 10% mayores a las de los medios sintéticos. Adicionalmente se logró observar una remoción significativa de nitrato (mayor al 50%) por parte de la microalga en el agua residual en un periodo de tiempo relativamente corto (3

días), caso contrario a la DQO la cual se vio incrementada significativamente. La principal razón de este resultado se asocia a la baja concentración y alta estabilidad de la materia orgánica que había presente en el agua residual. Como recomendación se propone evaluar el crecimiento de la microalga bajo condiciones no asépticas y su remoción de DQO, debido que las condiciones puntuales del experimento no permitieron verificar el consumo de materia orgánica por parte de la microalga. Los ensayos de la microalga en el BBM enriquecido con carbonato de sodio y glucosa demostraron que el carbono fue un factor limitante en los ensayos con los medios sintéticos al presentar productividades del 57,0 y 96,6% respectivamente mayores a las obtenidas en el blanco, además permitieron verificar que es posible estimular el metabolismo microalgal adicionando una adecuada concentración de carbono.

**Palabras clave:** fuentes sustentables, microalgas, biorremediación, fotobioreactores.

## INTRODUCCIÓN

El descubrimiento del petróleo ha producido un avance significativo en la tecnología y la industria, convirtiéndose en un recurso muy valioso e incluso podría pensarse, indispensable para la vida actual. Sin embargo, los múltiples inconvenientes que se han generado alrededor de éste, como su depleción y producción significativa de CO<sub>2</sub>, han producido una gran preocupación por el desarrollo de fuentes alternativas de energía que sean sustentables<sup>1</sup>.

La búsqueda de fuentes alternativas de energía se ha convertido entonces en una prioridad para los científicos. Frente a esto, son los biocombustibles los que se han postulado como una interesante y sustentable fuente alternativa de energía, la cual está basada en generar combustible a partir de aceite vegetal, como sustituto del diesel principalmente. Este en un principio fue generado a partir de cultivos como la soya, el girasol, la palma, el coco e incluso aceite usado, entre otros. Posteriormente, la necesidad de encontrar un tipo de cultivo que no compitiera con la demanda de alimentos y terreno, volcaron las investigaciones hacia uno de los organismos más antiguos de la tierra, las microalgas, las cuales debido a sus altas productividades y contenido de lípidos en comparación con los cultivos terrestres, obtuvieron la atención de los investigadores<sup>2</sup>.

El término microalga hace referencia a una gran cantidad de organismos vivos microscópicos que tienen la capacidad de realizar fotosíntesis a partir de algunos pigmentos fotosintéticos, principalmente la clorofila a. El término microalga no tiene un sentido taxonómico. Dentro de éstas están agrupados dos tipos de seres vivos: eucariotas y procariotas<sup>3</sup>. Dichos organismos es posible encontrarlos en una gran variedad de hábitats, teniendo como principal atributo que son considerados los productores primarios en el mar, dado que son la base de la cadena alimenticia y los fijadores de CO<sub>2</sub><sup>4</sup>.

El crecimiento de dichos organismos se rige por la ley del mínimo, es decir, crecerán en la medida que algún nutriente esencial para ellas sea consumido por completo. Como principal nutriente está el carbono (C), el cual lo pueden asimilar en su forma inorgánica, es decir, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) o de forma orgánica

---

<sup>1</sup> MUTANDA, T., *et al.* Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *En: Bioresourcetechnology*, Julio de 2011, No 102, p. 57.

<sup>2</sup> *Ibíd.*, p. 57.

<sup>3</sup> ROMO PIÑERA, Abril. Manual para el cultivo de microalgas. Trabajo de grado Biólogo Marino. La Paz: Universidad Autónoma de Baja California Sur. Departamento de Biología Marina. Diciembre de 2002. 65 p. (p. 3).

<sup>4</sup> *Ibíd.*, p. (p. 3).

cuando su metabolismo cambia a heterotrófico, éste lo obtienen normalmente de la atmósfera. Aunque se ha visto que si se adiciona una fuente de dicho nutriente al medio éstas pueden crecer mucho más rápido. El segundo nutriente más importante es el nitrógeno (N) el cual lo asimilan en forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y/o amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), siendo este último el preferido por las microalgas. El siguiente nutriente más importante es el fósforo (P), el cual es asimilado principalmente en forma de ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), este nutriente tiene el inconveniente de unirse con otros elementos y precipitarse, disminuyendo de esta forma su disponibilidad para su asimilación. Adicionalmente requieren en pequeñas cantidades algunos metales como el Boro (B), Zinc (Zn) y el Cobre (Cu)<sup>5</sup>.

Las microalgas toman los nutrientes anteriormente nombrados y vía fotosíntesis los transforman principalmente en proteínas, carbohidratos y lípidos, los cuales son compuestos valiosos para muchas industrias, por esta razón es común el uso de estos microorganismos en el sector de alimentos, cosméticos, salud, biocombustibles, entre otros<sup>6</sup>.

A pesar de los excelentes resultados obtenidos a nivel de laboratorio en la producción de biocombustibles a partir de microalgas, existen una serie de inconvenientes o preguntas a resolver antes de implementar esta tecnología a gran escala, como lo son encontrar una fuente externa de nutrientes los cuales con llevarían un alto costo de operación, establecer el mejor medio de cultivo, mejorar el suministro de  $\text{CO}_2$  ya que las concentraciones normales atmosféricas no son las suficientes para la capacidad de crecimiento de las microalgas, determinar las especies más idóneas para la producción de biocombustible, entre otras<sup>7</sup>.

Como solución al suministro de una fuente externa de nutrientes los estudios sugieren que es posible utilizar las aguas residuales domésticas, ya que estas poseen varios de los nutrientes esenciales para el crecimiento de las microalgas, como lo son el nitrógeno (N), el fósforo (P) y algunos metales traza, reduciendo de esta forma significativamente los costos de mantenimiento de un sistema de cultivo de microalgas, propiciando además una planta multipropósito, donde se realice un refinamiento en el tratamiento de las aguas residuales, se realice una

---

<sup>5</sup>RICHMOND, A. Handbook of Microalgal culture. Ed. Blackwell Science. Carlton. Australia. 2004, p. 102-106.

<sup>6</sup>Ibíd., p. 83.

<sup>7</sup>Kumar, A., Ergas, S., Yuang, X., Sahu, A., Zhang, Q., Dewulf, J., Malcata, F. X., et al. Enhanced  $\text{CO}_2$  fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. En: *Trends in biotechnology*, 2010, No 28, p. 378.

captación de CO<sub>2</sub> y se produzca biocombustible a partir de la biomasa generada<sup>8</sup>. Sin embargo, todos los estudios realizados en este campo sugieren que es necesaria más investigación, ya que existen muchos retos por superar, tales como el diseño de bioreactores o estanques abiertos que sea posible integrar con el tratamiento de aguas residuales y el cosechado de la biomasa para utilizarla posteriormente en la producción de biocombustible<sup>9</sup>.

Por otro lado, el aceite vegetal que se obtiene a partir de la biomasa es solo uno de los productos de valor que es posible generar, existen otros compuestos como proteínas y carbohidratos los cuales también se obtienen de la biomasa y pueden ser empleados en diversas industrias como la farmacéutica y alimenticia, este es un aspecto ampliamente estudiado que ha ganado gran interés por parte de los investigadores<sup>10</sup>. En este orden de ideas, recientes estudios han demostrado que es posible obtener biocombustible a partir de no solo la parte lipídica de las microalgas sino también de las proteínas, a partir de un proceso llamado licuefacción hidrotermal (HTL por sus siglas en inglés). Este hallazgo ampliaría el número de especies de microalgas que podrían ser empleadas para la generación de biocombustibles, eliminando la limitante de solo usar cepas que tengan un alto contenido de lípidos, sin embargo, dichos estudios señalan que es importante realizar investigaciones más a fondo que permitan esclarecer la influencia de la composición de la biomasa en la HTL<sup>11</sup>.

En el presente estudio se evaluó la posible implementación de una microalga nativa colombiana, como tratamiento terciario de un efluente de una Planta de Tratamiento de Agua Residual (PTAR) obteniendo a su vez como subproducto, una significativa cantidad de biomasa.

---

<sup>8</sup>ABDEL-RAOUF, N.; AL-HOMIDAN, A.y IBRAHEEM, I. Microalgae and wastewater treatment. En: Saudi Journal of Biological Sciences, Mayo del 2012, No 19, p. 270.

<sup>9</sup>CHRISTENSON, L., y SIMS, R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. En: Biotechnology advances, Junio de 2011, No 29, p. 699.

<sup>10</sup>RAMOS-SUARÉZ, J. y CARRERAS, N. Use of microalgae for biogas production. En: Chemical Engineering Journal. Diciembre de 2013, No 242, p. 86.

<sup>11</sup>Li, H., *et al.* Conversion efficiency and oil quality of low-lipid high-protein and high-lipid low-protein microalgae via hydrothermal liquefaction. En: Bioresource Technology, Diciembre de 2013, No 154, p. 322.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cultivo de microalgas se ha planteado como una solución transversal e integral a una gran cantidad de problemas ambientales. Hoy en día debido al crecimiento desmedido de la población mundial y la industrialización se ha generado un desbalance en los ciclos geológicos, produciendo de esta forma una serie de impactos ambientales que en los últimos años han empezado a afectar la calidad de vida de las personas de manera drástica<sup>12</sup>.

Un fenómeno importante a mencionar es el llamado cambio climático, que ha sido llamado de esta forma debido al cambio brusco que está sufriendo la temperatura del planeta, mostrando de esta forma una tendencia a aumentar. La causa principal que se le ha atribuido a este fenómeno es el aumento de las emisiones de los Gases de Efecto de Invernadero (GEI), los cuales tienen la propiedad de retener el calor, dichos gases son emitidos de manera natural por los seres vivos y algunos procesos geológicos, sin embargo, se ha observado un aumento considerable de las emisiones de estos gases por parte del ser humano desde 1750<sup>13</sup>.

El principal GEI emitido por el hombre es el CO<sub>2</sub> el cual se produce por la combustión de combustibles fósiles y en menor medida por los cambios en los usos del suelo. Cabe resaltar que el CO<sub>2</sub> es un gas que se encuentra de manera natural en la atmosfera y es en gran parte el responsable de la vida en la Tierra, permitiendo que las temperaturas en las noches no desciendan drásticamente tras el ocultamiento del sol. Sin embargo un aumento considerable en las concentraciones normales en la atmosfera puede generar un desequilibrio como el que se está presentando actualmente<sup>14</sup>.

El principal impacto que se ha observado por el cambio climático, como se dijo anteriormente, es un aumento en la temperatura global del planeta, desencadenando muy probablemente de esta forma los siguientes fenómenos: aumento en el nivel del mar, cambio en las pautas eólicas, aumento en los cambios de temperatura en las noches y el deshielo de los glaciares<sup>15</sup>.

---

<sup>12</sup>Enhanced CO<sub>2</sub> fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions, Op. Cit; p. 371.

<sup>13</sup> IPCC. Cambio Climático 2007: Informe de Síntesis. Ginebra. Suiza. 2007, p. 5.

<sup>14</sup>Ibid., p. 6.

<sup>15</sup>Ibid, p. 8.

Aunque la tendencia a aumentar las emisiones de los GEI depende en gran medida de las políticas y proyectos que se implementen en este ámbito, los pronósticos realizados por el Grupo Intergubernamental de Expertos en el Cambio Climático (IPCC por sus siglas en inglés) en su Informe de Síntesis realizado el 2007 no son muy alentadores, ya que según los resultados arrojados por el modelo utilizado, se espera en el mejor de los casos, es decir que se logren mantener constantes las emisiones, que la temperatura del planeta aumentara en los próximos años por lo menos 0,1 °C lo cual conllevaría serios impactos ambientales, económicos y sociales<sup>16</sup>.

Paralelo al cambio climático está el agotamiento del petróleo, el cual anticipa una crisis energética futura en caso de no encontrar fuentes alternativas de energía. Aunque actualmente se están desarrollando múltiples proyectos en busca de dichas fuentes de energía, son los biocombustibles, es decir, combustibles a partir de biomasa, los que se postulan como una de las alternativas más llamativas a éste y otros problemas. Debido a la capacidad de muchos organismos de producir ácidos grasos a partir del dióxido de carbono presente en la atmósfera y la energía lumínica del sol, por medio de la fotosíntesis, los biocombustibles se presentan como una posible solución a la mitigación de los efectos de los GEI y la producción de energía a partir de una fuente sostenible<sup>17</sup>.

Otra de las grandes preocupaciones a nivel mundial, asociadas en gran medida al cambio climático, es la crisis hídrica. El aumento significativo de la demanda de agua, el alargamiento de las temporadas de sequía y el aumento de la temperatura han puesto al planeta bajo un estrés hídrico nunca antes registrado, disminuyendo dramáticamente de esta forma la cantidad de agua potable disponible por habitante. Por otro lado, las aguas residuales se han convertido en otro inconveniente que agrava la deficiencia de agua, ya que en muchas regiones todavía se vierten directamente a los cauces de los ríos, propiciando de esta forma graves problemas ambientales y de salud pública<sup>18</sup>.

Aunque las composiciones de las aguas residuales son muy distintas entre sí, de forma general se puede establecer que estas contienen una mezcla compleja de compuestos orgánicos e inorgánicos además de compuestos sintéticos creados por el hombre y microorganismos. Debido a los compuestos que están disueltos en éstas, son un medio ideal para el crecimiento de bacterias, virus y protozoos, microorganismos que al llegar a las fuentes superficiales se convierten en un

---

<sup>16</sup>Ibid, p. 10.

<sup>17</sup> PHUKAN, M. M., *et al.* Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. En: Applied Energy, Enero de 2011, No 88, p. 3307.

<sup>18</sup>Microalgae and wastewater treatment. En: Saudi Journal of Biological Sciences, Op. Cit; p. 258.

problema de salud, al ser los causantes de enfermedades graves como el cólera, la fiebre tifoidea y la tuberculosis, entre muchas otras. Por otro lado, los compuestos orgánicos demandan oxígeno para su degradación, este en muchas ocasiones llega a valores cercanos a cero debido a que la tasa a la que se consume este es mucho mayor a la tasa de aireación, conllevando esto a la muerte de la mayoría de la fauna del río. Es por esta razón que el principal objetivo del tratamiento de las aguas residuales es el de disminuir esta carga de materia orgánica conocida como Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO)<sup>19</sup>.

Sin embargo, la carga orgánica e inorgánica no son los únicos inconvenientes que genera el agua residual, los nutrientes contenidos en esta provocan la llamada eutrofización. Este fenómeno es definido como un afloramiento desmedido de algas en los cuerpos de agua, debido al alto grado de enriquecimiento de nutrientes, las cuales al morir y sedimentarse agotan el oxígeno disuelto del agua en su proceso de descomposición<sup>20</sup>.

El cultivo de microalgas como se mencionó anteriormente es una posible solución a los múltiples problemas ambientales ocasionados por las diferentes actividades humanas, debido a su captación de CO<sub>2</sub> y producción de O<sub>2</sub> como parte de su metabolismo, sin embargo, todavía existen cuellos de botella que requieren ser examinados para tener total certeza sobre la implementación de estos microorganismos como una tecnología sostenible. Muchos de los estudios realizados han sido a escala de laboratorio, por ende, poco se sabe sobre su posible escalamiento, otro factor importante es el suministro adecuado de CO<sub>2</sub> para obtener altas tasas de crecimiento, lo cual también genera una limitación al momento de generar cultivos a gran escala. La búsqueda de fuentes alternativas de nutrientes para el crecimiento adecuado de las microalgas también es un aspecto clave que requiere ser estudiado para reducir costos, debido a que actualmente el cultivo de microalgas se realiza empleando fertilizantes, los cuales generan una alta huella de carbono al ser de origen fósil, frente a este aspecto se han planteado las aguas residuales debido a su alto contenido de amonio y fósforo. Adicionalmente, el cosechado, secado y extracción de lípidos para la generación de biodiesel son procesos que aún requieren de grandes cantidades de energía y/o químicos, motivo por el cual es necesario investigar otros métodos que sean más prácticos y eficientes<sup>21</sup>.

---

<sup>19</sup> Ibíd., p. 263.

<sup>20</sup> ROMERO, M. Proceso de Eutrofización de afluentes y su prevención por medio de tratamiento de efluentes. En: Revista de Ingeniería Primero, Junio de 2010, No 17, p. 66.

<sup>21</sup> Enhanced CO<sub>2</sub> fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions, Op. Cit; p. 379.



## 2. JUSTIFICACIÓN

La era moderna ha traído consigo grandes avances y con ello el llamado “desarrollo” el cual con tanto anhelo buscan los países, este a su vez se ha traducido en un aumento significativo del consumo de energías convencionales como el carbón y el petróleo, los cuales han despertado una gran preocupación a nivel mundial debido a sus impactos ambientales y económicos. Con esto, el desarrollo de los biocombustibles obtuvo especial atención, despertando la curiosidad de los científicos por esta nueva fuente de energía. En contraste, la producción de biodiesel derivado del aceite de microalgas tiene grandes ventajas sobre los cultivos convencionales, como las siguientes<sup>22</sup>:

- Las microalgas al tener una estructura simple, tienen una mejor eficiencia fotosintética teniendo de esta forma producciones mucho más altas que la de los cultivos convencionales.
- Puede cultivarse en aéreas no aptas para la producción de alimentos.
- La gran diversidad de especies de microalgas junto con sus diversos hábitats en los cuales crecen, ofrecen menos restricciones en cuanto a condiciones geográficas y climáticas para su cultivo.
- Al tener mejores eficiencias fotosintéticas, el secuestro de CO<sub>2</sub> por parte de estas es mucho mayor.
- Su capacidad de utilizar el CO<sub>2</sub> de plantas térmicas, las hace además una forma de mitigar el cambio climático.
- La utilización de biodiesel a partir de microalgas, contribuye en gran medida a mantener las emisiones de CO<sub>2</sub> y sulfuro cercanas a cero.
- Es posible obtener una gran variedad de valiosos productos a partir de las microalgas tales como proteínas, polisacáridos, pigmentos, fertilizantes, entre otros.
- Permiten diversificar la canasta energética de un país, disminuyendo de esta forma el riesgo de un colapso por una oferta limitada.

Sin embargo, el cultivo de microalgas es un proceso que demanda grandes cantidades de agua y nutrientes. Es por esto que las aguas residuales se han pensado como una posible solución a este factor, aunque algunos autores han señalado que el cultivo de microalgas con propósitos de producción de biodiesel en este tipo de aguas no es eficiente o viable, debido a la baja producción de biomasa y por ende biodiesel. Así mismo, han destacado que debe evaluarse la posibilidad de generar gas metano por medio de la digestión anaerobia de la biomasa, ya que son procesos que normalmente tienen las PTAR, lo cual no requeriría de un cambio significativo en la estructura de esta. En este mismo orden

---

<sup>22</sup> GIKONYO, B. Advances in Biofuel Production. Ed. Apple Academic Press. Oakville. Canada. 2014, p. 2.

de ideas, plantean investigar más afondo sobre la licuefacción hidrotermal, la cual consiste en generar biodiesel aprovechando no solo la parte lipídica de las microalgas sino también las proteínas que además poseen un alto valor energético<sup>23</sup>.

A pesar de las limitaciones de las aguas residuales en cuanto al cultivo de microalgas se han encontrado interesantes resultados desde el punto de vista de su tratamiento, encontrando que éstas tienen altos porcentajes de remoción de varios parámetros físico-químicos, tales como DBO<sub>5</sub>, DQO, nitrógeno, fósforo principalmente y otros nutrientes, alcanzando incluso remociones del 100% de fósforo en 10 días. Dichos resultados han impulsado a los investigadores a continuar la búsqueda de las mejores condiciones de cultivo de las microalgas, el tipo de agua residual más apta para su crecimiento, los posibles productos a obtener según las condiciones a las que se sometan, entre otras<sup>24</sup>.

Adicionalmente, el cultivo de microalgas en aguas residuales ha demostrado ser bastante efectivo cuando se manejan cultivos hiperconcentrados, logrando disminuir de manera considerable los tiempos de retención hidráulicos hasta valores de 1 hora con altas tasas de remoción. Las especies de microalgas más idóneas para el crecimiento en aguas residuales son *Euglena*, *Oscillatoria*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Nitzschia*, *Navicula* y *Stigeoclonium*, debido a su alta tolerancia a cargas orgánicas, actualmente la especie de microalga mas estudiada es *Chlorella sp.* debido además a su alto contenido de lípidos<sup>25</sup>.

El empleo de microalgas como un tratamiento terciario donde además se remueven metales pesados y otros compuestos tóxicos está ampliamente documentado, contando además como un proceso de desinfección debido al aumento del pH por el consumo de CO<sub>2</sub>. También se ha observado que al presentarse las condiciones adecuadas para el crecimiento de microalgas se inhibe el crecimiento bacteriano, los cuales son los principales focos de contaminación biológica en las aguas residuales, por otro lado, al remover nutrientes se previene la eutrofización, fenómeno que ocurre en varias partes del mundo y es uno de los causantes del deterioro de la calidad del agua. Las microalgas se han planteado además como un posible tratamiento secundario, sin

---

<sup>23</sup> PECCIA, J., *et al.* Nitrogen supply is an important driver of sustainable microalgae biofuel production. *En: Trends in biotechnology*, Marzo de 2013, No 31, p. 135-137.

<sup>24</sup> RASOUL-AMINI, S., *et al.* Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae free cells in bath culture system. *En: Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Septiembre de 2013, No 3, p. 128.

<sup>25</sup> Microalgae and wastewater treatment, Op. Cit; p. 262.

embargo, por ahora, los costos de infraestructura y tiempos de retención impiden su implementación<sup>26</sup>.

Por último, el campo de las microalgas es un área amplia por explorar, su utilización en diversas actividades económicas ofrece todo un mercado que impactar, a pesar de sus diferentes usos, todavía es poco lo que se sabe en relación por ejemplo al cultivo de microalgas a gran escala en ambientes no estériles, como las aguas residuales, con propósitos de generación de biocombustibles u otros productos de valor<sup>27</sup>.

---

<sup>26</sup> Ibid, p. 262-263.

<sup>27</sup> CAI, T.; PARK, S. & LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *En: Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Noviembre de 2012, No 19, p. 367.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el uso de las aguas residuales domésticas de la Universidad Autónoma de Occidente como medio de cultivo natural para la microalga nativa *Chlorella sp.* CM1 y simultáneamente su capacidad para remover nitrato y DQO de dichas aguas.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Comparar los rendimientos en producción de biomasa en el agua residual con los obtenidos en un medio sintético.
- Determinar la capacidad de remoción de nutrientes y/o parámetros físico-químicos del agua residual por parte de la microalga estudiada.
- Determinar algunos factores limitantes presentes en las aguas residuales que afecten los rendimientos en producción de biomasa.

## 4. MARCOS DE REFERENCIA

### 4.1. ESTADO DEL ARTE

Las microalgas son uno de los organismos vivos más antiguos e importantes en la Tierra, siendo los productores primarios de los océanos, hecho que no ha cambiado a lo largo del tiempo. Su gran capacidad de adaptación, la diversidad de especies que existen y su estructura simple les han permitido sobrevivir durante muchos años en diversos ecosistemas, logrando encontrar dichos organismos normalmente en ambientes extremos, tales como cavernas, suelos desérticos, lagos hipersalinos, entre otros. Su rol en el ambiente es clave ya que como se mencionó anteriormente, son los precursores al flujo de energía y son indispensables en el balance de oxígeno<sup>2829</sup>.

Aunque las microalgas han estado presentes en el planeta muy probablemente desde antes del ser humano, su primer uso por el hombre se remonta hace 2000 años atrás, cuando a raíz de la hambruna, los Chinos recurrieron a la cepa *Nostoc* como alimento<sup>30</sup>. A pesar de esto, es solo unas décadas atrás cuando se empezó el cultivo de microalgas<sup>31</sup>.

En contraste, el empleo de microalgas por parte del hombre se realizó mucho antes de que éste tuviera una noción clara sobre estos microorganismos, es de esta forma como Hensen en 1887 utilizó por primera vez el término “plancton” para definir a todas las partículas vivas o muertas que se movilizaban a merced del agua, teniendo en cuenta que el plancton está compuesto por 2 tipos: el zooplancton y el fitoplancton, este último comprende un grupo amplio de organismos autótrofos, principalmente microorganismos, que muchos años después con el comienzo de una nueva ciencia, la biorefinería, aparecería el término microalga haciendo alusión a dichos microorganismos<sup>32</sup>.

La gran cantidad de compuestos de valor obtenidos a partir del cultivo de microalgas impulsó rápidamente su implementación en la industria, fue entonces

---

<sup>28</sup> Manual para el cultivo de microalgas, Op. Cit; p.3.

<sup>29</sup> GOMEZ, Liliana. Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos. En: Revista cubana de química, Junio de 2007, vol. 19, p. 3-4.

<sup>30</sup> PRIYADARSHANI, I. & RATH, B. Commercial and industrial applications of micro algae – A review. En: Journal of Algal Biomass Utilization, Marzo de 2012, no. 3, p. 89.

<sup>31</sup> SPOLAORE, P., *et al.* Commercial applications of microalgae. En: Journal of bioscience and bioengineering, Julio de 2005, vol. 101, no. 2, p. 87.

<sup>32</sup> Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos. Op. Cit; p. 3.

en los años 60's en Japón, cuando apareció por primera vez el primer cultivo a gran escala, siendo la especie *Chlorella* la empleada en dicho cultivo. Posteriormente en los años 70's se estableció la instalación de cosecha y cultivo de la cepa *Arthrospira* en México, para los años 80's ya existían 46 fábricas dedicadas a la producción de biomasa (*Chlorella* principalmente) en Asia. Fue de esta forma como el cultivo e investigación de microalgas se replicó rápidamente en las diferentes regiones del mundo<sup>33</sup>.

Hoy en día existe un amplio mercado de microalgas en diferentes sectores económicos, como principales cabe mencionar su uso como alimento y suplemento alimenticio para el hombre y animales, en la industria de cosméticos, como biofertilizantes, en la industria farmacéutica y en el tratamiento de aguas residuales. Por último, pero no menos importante puede existir un mercado potencial en la generación de combustibles de tercera generación, en los que las cepas con mayor potencial son *Chlorellavulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, *Dunaliella salina* y *Spirulina máxima*<sup>34</sup>.

Una de las últimas tendencias en el estudio de microalgas es la búsqueda en la integración del tratamiento de aguas residuales junto con la producción de biocombustibles, con el fin de reducir los costos de producción al suministrar una fuente externa de nutrientes<sup>35</sup>, en este orden de ideas la implementación de aguas residuales se ha propuesto como un medio de cultivo natural alternativo para la generación de biomasa destinada a la producción de biocombustibles. La alta carga orgánica del agua residual permite desarrollar el crecimiento mixotrófico de algunas especies de microalgas eliminando de esta forma la dependencia en el crecimiento autotrófico<sup>36</sup>.

El crecimiento de microalgas en aguas residuales es un aspecto ampliamente estudiado, teniendo como principales variables, el empleo de diferentes efluentes dentro de la misma planta, diferentes tipos de agua residual, suministro de CO<sub>2</sub> como estimulante del metabolismo autotrófico de las microalgas, el empleo de diferentes cepas y la implementación de diferentes sistemas de cultivo, entre otros<sup>37</sup>. La variable principalmente empleada para comparar el crecimiento de las

---

<sup>33</sup> Commercial applications of microalgae. Op. Cit; p. 87.

<sup>34</sup> Commercial and industrial applications of micro algae – A review. Op. Cit; p. 90-92.

<sup>35</sup> SAMORÍ, G., *et al.* Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: part I. *En: Water research*, Noviembre de 2012, no. 47, p. 791-792.

<sup>36</sup> ADVANCES IN BIOFUEL PRODUCTION. Op. Cit; p. 4.

<sup>37</sup> MAITY, J., *et al.* Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives - A mini review. *En: Energy*, Enero de 2014, p. 5-6.

microalgas en diferentes medios de cultivo o configuraciones es la tasa específica de crecimiento y en menor medida la productividad volumétrica o por área. En este sentido, son múltiples los resultados obtenidos, presentando gran variación entre los diversos estudios. En el Cuadro 1 se muestran las diferentes tasas específicas de crecimiento y/o productividades obtenidas en diferentes estudios. Cabe resaltar que los resultados presentados en la Cuadro 1 y 2, son estudios realizados en fotobioreactores batch a escala de laboratorio, en estas se pueden observar una gran variación de los resultados en función de los medios de cultivo, lográndose apreciar una alta afinidad de la cepa *Chlorella* con el agua residual. En este orden de ideas, se puede apreciar que la tasa de crecimiento más alta la registra un estudio realizado por Wang, L., *et al.*, 2009, donde se cultivó la microalga *Chlorella sp.* en un efluente tratado de la línea de lodos, obteniendo de esta forma una tasa específica de crecimiento de  $0,948\text{ d}^{-1}$ . Por otro lado, se puede observar que la productividad más alta fue obtenida por Hulatt, C. y Thomas, D., 2011, cultivando la microalga *Chlorella vulgaris* en un medio de cultivo sintético suministrando aire enriquecido con 12% de  $\text{CO}_2$  a un flujo de 0,005 m/s. lastimosamente es difícil comparar ambos estudios debido a que manejan parámetros de crecimiento diferentes.

Por otro lado, la capacidad de las microalgas de crecer en aguas residuales ha impulsado su estudio como depuradoras naturales de contaminantes inorgánicos, tales como el N, P y DQO, como también de algunos metales pesados que son altamente tóxicos para el ser humano y los animales, los cuales prevalecen al final de los tratamientos convencionales de las aguas residuales<sup>38</sup>. Debido a que las microalgas se han contemplado como un posible tratamiento terciario, muchos estudios han sido dirigidos hacia la determinación de las eficiencias de remoción de N y P, pero se ha encontrado que también pueden remover la Demanda Química de Oxígeno (DQO), dependiendo de las características propias del agua residual. En la Cuadro 2 se presentan los resultados de algunos estudios realizados en diferentes partes del mundo con diferentes aguas residuales, lográndose apreciar en ésta la gran diferencia que se puede presentar en dichas aguas dependiendo de las condiciones locales y del nivel de tratamiento. Por otro lado se puede observar las altas tasas de remoción que pueden alcanzar las microalgas tanto de nitrógeno como de DQO, presentando tasas de remoción de hasta 100% de amoníaco y 86,24% de DQO, ambos en 7 días. El consumo de diferentes formas de nitrógeno presentes en las aguas residuales también es posible verificarlo según los estudios presentados, siendo el nitrato el que se presenta en más altas concentraciones y el amoníaco el de mayor consumo. Cabe resaltar que es posible que las microalgas puedan incrementar la concentración de DQO dependiendo de las condiciones de la materia orgánica presente en el agua

---

<sup>38</sup>RAZZAK, S., *et al.* Integrated  $\text{CO}_2$  capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing - A review. En: Renewable and Sustainable Energy Reviews, Agosto de 2013, no. 27, p. 623-624.

residual, tal como se muestra en el estudio realizado por Wang, L., *et al*, en el año 2009.

**Cuadro1 Tasas de crecimiento de *Chlorella* sp.**

Cepa	Medio de cultivo	Tasa de crecimiento (d <sup>-1</sup> )	Productividad Volumétrica (mg/L*d)	Referencia
<i>Chlorella vulgaris</i>	Combo medium modificado con aire enriquecido en un 5% con CO <sub>2</sub>	0,648	73	39
<i>Chlorella kessleri</i>	Combo medium modificado con aire enriquecido en un 5% con CO <sub>2</sub>	0,624	114	
	Efluente tratado de agua residual domestica con aire enriquecido en un 5% con CO <sub>2</sub>	0,624	111,3	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Agua residual artificial complementado con micronutrientes de f/2 de Girard	0,183		40
<i>Chlorella</i> sp.	Agua residual antes de sedimentación primaria	0,412		41
	Agua residual después de sedimentación primaria	0,429		
	Efluente tratado de agua residual domestica	0,343		
	Efluente tratado de línea de lodos de ARD	0,948		

<sup>39</sup> ARBIB, Z., *et al*. Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: wastewater tertiary treatment, CO<sub>2</sub> bio-fixation and low cost biofuels production. En:Waterresearch, Octubre de 2013, No 49. P. 468.

<sup>40</sup> ANTONIO, N., *et al*. Densidad celular y acumulación de lípidos en cultivos libres de *Chlorellavulgaris* y *Neochlorisoleoabundans* a diferentes concentraciones de nitrógeno y carbonato de sodio. En:UnacarTecnociencia, Diciembre de 2010, No 5, p. 66.

<sup>41</sup> WANG, L., *et al*. Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant.En:Appliedbiochemistry and biotechnology, Noviembre de 2009, No 162.



**Cuadro 1 Tasas de crecimiento de *Chlorella sp.* (Continuación)**

Cepa	Medio de cultivo	Tasa de crecimiento (d <sup>-1</sup> )	Productividad Volumétrica (mg/L*d)	Referencia
<i>Chlorella vulgaris</i>	BBM con concentración de N de $2,55 \cdot 10^{-3}$ M		260	42
	BBM con concentración de N de $3,95 \cdot 10^{-4}$ M		90	
<i>Chlorella sp.</i>	S&K	0,28		43
<i>Chlorella vulgaris</i>	Formulación M8 con 12%CO <sub>2</sub> a un flujo de 0,005 m/s		380	44
	Formulación M8 con 4%CO <sub>2</sub> a un flujo de 0,005 m/s		400	
	Formulación M8 con 0,04%CO <sub>2</sub> a un flujo de 0,005 m/s		60	

**Cuadro 2 Eficiencias de remoción de Nitrógeno y DQO por parte de *Chlorella sp.***

Cepa	Tipo de agua residual	Nitrato (NO <sub>3</sub> )			Demanda Química de Oxígeno (DQO)			Ref.
		Concentración inicial (mg/L)	TRH (d)	Eficiencia de Remoción (%)	Concentración inicial (mg/L)	TRH (d)	Eficiencia de Remoción (%)	
<i>Chlorella sp.</i> (YG02)	Efluente secundario de PTAR	190,7	4	51,41				45
			7	62,87	-	-	-	
			10	65,54	-	-	-	

<sup>42</sup> IDROBO, G.; FLOREZ, L. y LOPEZ, J. Aumento de lípidos totales mediante depleción de nitrógeno en microalgas: camino errado para el aumento de la productividad lipídica para biodiesel. En: V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Biocombustibles, Mayo de 2012, p. 169.

<sup>43</sup> IDROBO, G., *et al.* Biomasa de microalga nativa colombiana para biocombustibles con balance de CO<sub>2</sub> y huella hídrica positivos. En: V Congresos Internacional De Ciencia y Tecnología De los Biocombustibles, Mayo de 2012, p. 151.

<sup>44</sup> HULATT, C. y THOMAS, D. Productivity, carbon dioxide uptake and net energy return of microalgal bubble column photobioreactors. En: Bioresource technology, Marzo de 2011, No 102, p. 5778.

<sup>45</sup> RASOUL-AMINI, S., *et al.* Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae free cells in bath culture system. En: Biocatalysts and Agricultural Biotechnology, Septiembre de 2013, no. 3, p. 128.

**Cuadro 2 Eficiencias de remoción de Nitrógeno y DQO por parte de *Chlorella* sp.(Continuación)**

Cepa	Tipo de agua residual	Nitrato (NO <sub>3</sub> )			Demanda Química de Oxígeno (DQO)			Ref .
		Concentración inicial (mg/L)	TRH (d)	Eficiencia de Remoción (%)	Concentración inicial (mg/L)	TRH (d)	Eficiencia de Remoción (%)	
<i>Chlorella</i> sp.	Efluente final PTAR	16,95	9	62,5	42,2	9	-22,7	46
<i>Desmodesmus communis</i>	Efluente primario de PTAR	55,92*	7	100	-	-	-	47
<i>Chlorella vulgaris</i>	Efluente final PTAR	22,6**	79 horas	55,75	-	-	-	48
<i>Chlorella</i> sp.	Efluente de lodos diluido con efluente final PTAR	221**	7	47,06	454	7	86,34	49
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Efluente final PTAR (tratamiento secundario)	30	2	100	-	-	-	50
<i>Chlorella vulgaris</i>	Efluente final PTAR	50***	4	98,1	300	4	79,8	51

\*NH<sub>3</sub>

\*\*Nitrógeno total

\*\*\*NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

<sup>46</sup> WANG, L., *et al.* Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. En: Applied biochemistry and biotechnology, Noviembre de 2009, no. 162.

<sup>47</sup> Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: part I. Op. Cit; p. 793-798.

<sup>48</sup> Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: wastewater tertiary treatment, CO<sub>2</sub> bio-fixation and low cost biofuels production. Op. Cit; p. 470-471.

<sup>49</sup> AKERSTROM, A., *et al.* Biomass production and nutrient removal by *Chlorella* sp. as affected by sludge liquor concentration. En: Journal of environmental management, Mayo de 2014, no. 144, p. 122-123.

<sup>50</sup> LIZZUL, A. M., *et al.* Combined remediation and lipid production using *Chlorella sorokiniana* grown on wastewater and exhaust gases. En: Bioresource technology, Octubre de 2013, no. 151, p. 17.

<sup>51</sup> LI, C., *et al.* Novel bioconversions of municipal effluent and CO<sub>2</sub> into protein riched *Chlorella vulgaris* biomass. En: Bioresource technology, Diciembre de 2012, no. 132, p. 174.

## 4.2. MARCO TEORICO

**4.2.1. Generalidades de las microalgas.** El término microalga, es un término normalmente usado para referirse a un amplio grupo de microorganismos fotosintéticos. Por lo general eucariotas, sin embargo, cabe resaltar que las cianobacterias que son procariotas, también son incluidas generalmente en este grupo. Las microalgas también son nombradas como talofitas, que hace alusión a plantas sin tallos, hojas, sistema vascular y embriones. Estas pueden ser autotróficas, lo cual implica que utilizan el CO<sub>2</sub>, la luz solar y sales para su crecimiento, o pueden ser heterotróficas, donde su crecimiento se da a través del consumo de compuestos orgánicos y nutrientes. Los principales criterios para catalogar a un microorganismo como microalga son la pigmentación, el ciclo de vida y su estructura celular básica. Las microalgas albergan 2 divisiones de las células procariotas y nueve de las eucariotas<sup>52</sup>.

Como principales factores ambientales que afectan el crecimiento de las microalgas cabe mencionar la luz, la temperatura, el pH, la salinidad, la cantidad de nutrientes disponibles, el oxígeno disuelto y la presencia de compuestos o elementos tóxicos. La luz es un importante factor para las microalgas debido a que generalmente es la fuente de energía, la cual normalmente es la radiación solar. Adicionalmente los principales nutrientes requeridos por las microalgas son el carbono, el nitrógeno y el fósforo, en orden de importancia descendente. El nitrógeno especialmente está relacionado con el metabolismo primario al ser parte de los ácidos nucleicos y las proteínas; las especies de microalgas con rápidos crecimientos prefieren el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> que el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como fuente de N, cuando estas crecen en un ambiente con déficit de N, tienden a generar una mayor cantidad de lípidos como respuesta a ese estrés ambiental. Por otro lado la temperatura es un factor determinante en la morfología y fisiología, de esta forma, mientras mayor sea ésta más acelerado es el metabolismo de las microalgas, mientras que una disminución en la temperatura podría llevar a la inhibición de su crecimiento. La temperatura óptima de crecimiento se ha reportado en un rango de 15 a 26°C, obteniendo máximas densidades a 23 °C. En relación al pH, las microalgas han demostrado habitar en un amplio rango de pH, entre 4 a 9, prefiriendo generalmente un pH neutro. Este parámetro está íntimamente relacionado con la concentración de CO<sub>2</sub> en el medio, teniendo como inconveniente, que una mayor concentración de CO<sub>2</sub> conlleva a una mayor producción de biomasa pero disminuirá el pH. Por otro lado se ha observado que el pH en estanques abiertos tiende a subir hasta valores de 10 a 11 debido al consumo de CO<sub>2</sub>, generando de esta forma una inactivación de los patógenos que pueda contener el agua, pero presentando como inconveniente

---

<sup>52</sup>Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. Op. Cit; p. 58.

que puede también producir la inhibición en el crecimiento de las microalgas, como además la especiación del  $\text{NH}_4^+$  al  $\text{NH}_3$ <sup>53</sup>.

**4.2.2. Sistemas de cultivo.** A lo largo de la historia se han desarrollado múltiples diseños de fotobioreactores y estanques a cielo abierto, existiendo incluso híbridos entre ambos, buscando siempre las mejores condiciones de cultivo y la forma más eficiente de utilizar la luz solar, la cual es una de las principales factores limitantes en el cultivo a gran escala debido al fenómeno llamado auto sombreado. Los diseños varían desde una capacidad de unos cuantos litros a grandes reactores capaces de albergar varios metros cúbicos, existiendo de esta forma un gran número de posibles sistemas de cultivo.

En este orden de ideas, el cultivo de microalgas esencialmente se puede dividir en dos tipos; sistemas cerrados (Fotobioreactores) y sistemas abiertos (tanques a cielo abierto). La palabra fotobioreactor hace referencia a un cultivo en el cual la mayor parte de la luz no incide directamente sobre el cultivo, en vez de esto, debe pasar a través de la pared transparente del reactor para llegar al cultivo. Es por este motivo que los fotobioreactores son considerados sistemas cerrados. Estos a su vez pueden clasificarse en diferentes tipos teniendo como criterio su operación o su diseño, es de esta forma como de acuerdo con su operación se pueden clasificar en: (1) mezclados por burbujeo, (2) de fase única y (3) de doble fase. De acuerdo a su diseño se pueden clasificar en: (4) plana o tubular, (5) horizontal, vertical, inclinado o espiral, (6) colector o serpentina<sup>54</sup>. La principal ventaja de los sistemas cerrados es su control sobre la contaminación del cultivo, variable que es importante si se requiere de un monocultivo, adicionalmente por lo general permiten un mejor control sobre algunos parámetros importantes en el crecimiento de las microalgas tales como: pH, iluminación, temperatura, entre otros, permitiendo de esta forma alcanzar altas productividades de biomasa. Por otra parte, los fotobioreactores acarrear unos mayores costos de construcción y mayor complejidad de operación<sup>55</sup>.

Los estanques a cielo abierto por su parte son los de mayor implementación en el cultivo de microalgas debido a su fácil y bajo costo de construcción, su diseño y materiales de construcción, varían en gran medida en función de los recursos disponibles y los requerimientos específicos del cultivo, estos de forma general se pueden clasificar en 3 tipos: (1) sistemas inclinados donde la agitación se logra a

---

<sup>53</sup>Enhanced CO<sub>2</sub> fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions, Op. Cit; p. 373-374.

<sup>54</sup>Handbook of microalgal culture. Op. Cit; p. 183.

<sup>55</sup>Enhanced CO<sub>2</sub> fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions, Op. Cit; p. 374-375.

través de burbujeo o gravedad, (2) estanques circulares donde la agitación se realiza a través de brazo mecánico rotatorio y (3) estanques de pista rotatoria sin fin. Estos dos últimos junto a los estanques a cielo abierto son utilizados en el cultivo comercial de microalgas<sup>56</sup>.

**4.2.3. Formas de cultivo.** Las formas de cultivo hacen referencia a si existe o no flujo de medio de cultivo hacia o desde el reactor, permitiendo de esta forma clasificar las formas de cultivo en 4: (1) En lote, (2) Continuo, (3) Semi-continuo, adicionalmente se considera como forma de cultivo (4) Inmovilizado.

El cultivo en lote es el principalmente usado en estudios científicos debido a su fácil manejo y garantía de condiciones asépticas, este consiste en cultivar la microalga inoculando una cantidad determinada en un volumen limitado de medio de cultivo, incubando de esta forma bajo condiciones de temperatura e iluminación adecuadas para el crecimiento. El suministro de CO<sub>2</sub> normalmente se realiza inyectando aire enriquecido con este. La iluminación se puede realizar de forma sintética (con lámparas) o de forma natural (luz solar). En esta forma de cultivo es posible observar las diferentes fases de crecimiento que presenta la microalga, las cuales están ligadas principalmente a los cambios en el medio de cultivo.

Las fases del crecimiento de las microalgas se pueden dividir en 4: (1) fase de latencia, la cual se observa cuando el crecimiento de la microalgas es mínimo o nulo, esta se presenta normalmente cuando la microalga es cambiada bruscamente de condiciones de cultivo, lo cual genera una fase de adaptación previa a la división celular o (2) fase exponencial, en esta el crecimiento celular se presenta de forma exponencial (o logarítmica) a medida que se consume el sustrato, posteriormente se presenta la (3) fase lineal donde el crecimiento se detiene y la concentración de células se mantiene constante, esta fase se presenta principalmente debido a la escasez de nutrientes o luz. Finalmente una vez agotados los nutrientes y agotadas las reservas de energía se presenta la (4) fase de decaimiento en el cual la muerte celular predomina, disminuyendo de esta forma la concentración de biomasa.

Los cultivos continuos son aquellos que son alimentados constantemente con medio de cultivo fresco y es expulsada simultáneamente una cantidad determinada de medio de cultivo, ya sea de forma constante o intermitente. Este sistema se implementó debido a la necesidad de suministrar nutrientes los cuales se encuentran en constante agotamiento y la necesidad de eliminar productos

---

<sup>56</sup>. Integrated CO<sub>2</sub> capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing - A review. Op. Cit; p. 626-627.

inhibitorios expulsados al medio por parte de las microalgas. Los cultivos semi-continuos o alimentados en lote por lo tanto, son aquellos que son alimentados con un volumen determinado de medio de cultivo cada cierto periodo de tiempo, expulsando parte del cultivo de la misma forma<sup>57</sup>.

Finalmente los cultivos inmovilizados consisten en generar un medio de soporte sobre el cual la microalga no esté suspendida sino sujeta o adherida. En este sentido existen dos tipos de medios de soporte, un medio de soporte químico con agar, el cual consiste en preparar un medio sólido sobre el cual la microalga quede atrapada, el segundo consiste en generar un medio poroso que absorba la microalga y de esta forma quede inmovilizada en dicho material de soporte<sup>58</sup>.

**4.2.4. Sustancias inhibitorias en el crecimiento de las microalgas.** A lo largo de la experimentación con el cultivo de microalgas, se ha logrado determinar que existen algunas sustancias inhibitorias en su crecimiento, expulsadas por ellas mismas como resultado de sus procesos metabólicos, presentándose dicho fenómeno principalmente en cultivos altamente densos y/o en los cuales el medio de cultivo no es reemplazado periódicamente o por lo menos suministrado constantemente.

Aunque es poco lo que se tiene comprendido de este fenómeno, se sabe que obedece a condiciones específicas del medio de cultivo y de la misma cepa, presentándose incluso dependiendo de los materiales con los cuales estén contruidos los reactores para el cultivo de las microalgas<sup>59</sup>. Por otro lado es bien sabido que existen ciertos compuestos como el amonio, que si bien son necesarios o pueden ser utilizados por las microalgas para su crecimiento, concentraciones por encima de los 18 mg/L pueden producir una inhibición en el crecimiento de estas, este valor puede variar dependiendo de la especie, sin embargo, cabe resaltar que este compuesto es muy inestable y volátil por lo cual dependiendo de condiciones de pH y temperatura fácilmente puede reducirse a amoníaco, el cual es considerado como toxico para las microalgas<sup>60</sup>.

---

<sup>57</sup> Handbook of microalgal culture. Op. Cit; p. 49-50.

<sup>58</sup> SHI, J.; PODOLA, B. & MELKONIAN, M. Application of a prototype-scale Twin-Layer photobioreactor for effective N and P removal from different process stages of municipal wastewater by immobilized microalgae. En: Bioresource technology, Diciembre de 2013, no. 154, p. 260-261.

<sup>59</sup> Handbook of microalgal culture. Op. Cit; p. 145.

<sup>60</sup> Nitrogen supply is an important driver of sustainable microalgae biofuel production. Op. Cit; p. 135.

El dióxido de carbono el cual es el principal nutriente para el crecimiento autotrófico de las microalgas, puede resultar inhibitorio si se presenta en concentraciones tales que disminuya de manera drástica el pH, de igual forma ocurre con los Óxidos de Nitrógeno y de Azufre. Entre otros compuestos tóxicos cabe nombrar los metales pesados, los cuales al igual que el amonio dependiendo de su concentración pueden reducir la productividad en biomasa de las microalgas o incluso inhibir su crecimiento. Finalmente incluso el oxígeno disuelto (OD) en el medio puede actuar como un compuesto inhibitorio, sin embargo, esto solo se presenta bajo condiciones extremas de súper saturación de oxígeno disuelto (OD > 35 mg/L)<sup>61</sup>.

**4.2.5. Métodos de medición de biomasa y crecimiento.** La determinación de la cantidad de biomasa contenida en un volumen conocido de medio de cultivo es uno de los principales parámetros a monitorear en la experimentación con microalgas, ya que a partir de este parámetro se pueden determinar los efectos positivos y negativos de someter estos microorganismos a unas ciertas condiciones. Para este objetivo se han desarrollado múltiples técnicas, sin embargo son 3 las más ampliamente usadas en los estudios científicos: (1) Peso seco, (2) Cámara de Neubauer y (3) Espectrofotometría.

El peso seco consiste básicamente en separar las microalgas del medio de cultivo a través de filtración o centrifugación, luego se procede a pesar la cantidad separada, esto se logra al pasar un volumen conocido del cultivo de microalgas a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro y secar el filtro hasta un peso constante. Normalmente se emplea una temperatura de 100 °C y 1 hora de secado. El filtro es pesado antes y después de filtrar la muestra, de esta forma la diferencia corresponde al peso de las microalgas. Al dividir el peso sobre el volumen de muestra se obtiene la concentración del cultivo que normalmente se expresa en g/L<sup>62</sup>.

El conteo de células realizado a través de cámara de Neubauer consiste en tomar una muestra del cultivo e introducirlo en un Hematocitómetro también llamado cámara de Neubauer. Este tiene un volumen determinado y una cuadrícula grabada en él, posteriormente se observa por medio del microscopio cuántas células hay presentes en las cuadrículas, de esta forma el resultado del procedimiento se expresa en células/mL<sup>63</sup>.

---

<sup>61</sup> Enhanced CO<sub>2</sub> fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. Op. Cit; p. 373-374.

<sup>62</sup> Handbook of microalgal culture. Op. Cit; p. 43.

<sup>63</sup> Manual para el cultivo de microalgas, Op. Cit; p. 36.

La determinación de cantidad de biomasa por espectrofotometría es ampliamente usada debido a su rápido y fácil empleo, esta permite principalmente observar el crecimiento de cultivos a través de su medida. Por medio de un espectrofotómetro se mide la absorbancia de una muestra de cultivo a una longitud de onda de 750 nm. Debido a que la absorbancia está relacionada con la concentración de microalgas, se puede afirmar que a mayor absorbancia mayor concentración de microalgas, permitiendo de esta forma incluso calcular tasas de crecimiento a través de dicha técnica<sup>64</sup>. Esta técnica está relacionada con otra técnica de medición de biomasa, las curvas de calibración, la cual consiste en medir la absorbancia de varias muestras a diferentes concentraciones. Una vez se tienen los datos de la relación entre estas dos variables se realiza una regresión lineal, obteniendo de esta manera una ecuación lineal de la siguiente forma:

$$y = mx + b \text{ Ecuación (1)}$$

Donde “*m*” es la pendiente de la recta, “*y*” es la intersección con el “eje x”, tanto “*m*” como “*y*” son coeficientes adimensionales, “*x*” la variable independiente, que en este caso es la concentración de biomasa. De esta forma, a través de la ecuación (1) cualquier valor de absorbancia es fácilmente convertido en concentración de biomasa en g/L o mg/L<sup>65</sup>.

Finalmente los parámetros de crecimiento indican la velocidad a la cual se reprodujo la microalga bajo determinadas condiciones. Este parámetro permite comparar resultados entre estudios al expresar tasas de división y no concentraciones, en este sentido la tasa específica de crecimiento es ampliamente usada y es posible calcularla de diferentes formas, una de las alternativas para dicho cálculo es a través de la siguiente expresión:

$$k = \frac{\ln(X_t) - \ln(X_0)}{t} \text{ Ecuación (2)}$$

Donde “*k*” representa la tasa específica de crecimiento en unidades de 1/tiempo, normalmente expresada en 1/días o en 1/horas, “*X<sub>t</sub>*” es la concentración del cultivo en un tiempo *t* en g/L o mg/L y finalmente *X<sub>0</sub>* es la concentración inicial del cultivo<sup>66</sup>.

---

<sup>64</sup> Ibíd., p. 37.

<sup>65</sup> Ibíd., p. 38.

<sup>66</sup> GONZALEZ, L. Influencia de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en las interacciones competitivas entre *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*. Trabajo de grado Maestría en



Por otro lado el crecimiento en fotobioreactores normalmente se analiza utilizando la productividad neta o productividad la cual básicamente expresa el cambio en la concentración del cultivo en un tiempo determinado, lográndose obtener a partir de la siguiente ecuación:

$$P = \frac{C_t - C_0}{t} \text{ Ecuación (3)}$$

Siendo “ $P$ ” la productividad en mg/L\*d o g/L\*d, “ $C_t$ ” la concentración en un tiempo  $t$  y “ $C_0$ ” la concentración inicial del cultivo<sup>67</sup>.

---

ciencias. Palmira. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Biología. Mayo de 2010. 65 p. (p. 12).

<sup>67</sup>Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: wastewater tertiary treatment, CO<sub>2</sub> bio-fixation and low cost biofuels production. Op. Cit; 467.

## 5. METODOLOGÍA

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad Autónoma de Occidente (UAO) ubicada en el municipio de Santiago de Cali, Colombia. Los análisis de calidad de agua se realizaron en el Laboratorio de Ambiental ubicado en la misma Universidad.

Para evaluar el crecimiento de la microalga en el agua residual, primero se analizó el crecimiento de esta en un medio sintético donde las concentraciones de todos los macro y micronutrientes son conocidas y se garantiza que hay una adecuada cantidad y relación entre nutrientes. Debido que para *Chlorella sp.* existen varios medios de cultivo formulados, se analizó su crecimiento en dos principalmente, el medio Sorokin & Krauss y el Medio Basal de Bold. Posteriormente se analizó su crecimiento en agua residual doméstica y los porcentajes de remoción de nitrato y DQO. Finalmente con el objetivo de evaluar si la adición de una fuente de carbono podría mejorar el crecimiento de la microalga, se realizó su cultivo en el Medio Basal de Bold con adición de 2 diferentes concentraciones de carbono tanto inorgánica como orgánica.

### 5.1. MATERIALES Y MÉTODOS

**5.1.1. Material biológico y condiciones de cultivo.** El material biológico empleado en el presente proyecto fue una cepa nativa colombiana de la especie *Chlorella*, aislada previamente por el profesor Godfrey Idrobo Libreros en el laboratorio de Bioprocesos de la UAO en el año 2012. Esta se cultivó en un frasco boeco de 2 Litros utilizando como medio, el Medio Basal de Bold (BBM)<sup>68</sup> a una temperatura de 25°C. La iluminación se mantuvo constante por medio de cuatro lámparas Cool White de 2500watts, proporcionando una intensidad de luz de 1160 Lux, esta fue medida a través de un Luxómetro Digital Extech como se muestra en la Figura 1, con un fotoperiodo 12:12. La agitación del cultivo se realizó con un sistema de bombeo de aire desde el fondo del boeco, esta agitación se hizo por medio de un sistema que comprendió: una bomba (AIR PUMP AC 1500 marca RESUN), un tapón de algodón de 1,5 g, un sistema de mangueras, una cánula de vidrio y un pre filtro de algodón de 0,5 g.

En la figura 2 se muestra una vista de la microalga observada en el microscopio. Es importante aclarar que para la reactivación de la cepa, el cultivo “madre” inicialmente se mantuvo en un frasco boeco de 500 mL con 200 mL de medio,

---

<sup>68</sup>Handbook of microalgal culture. Op. Cit; p. 103.

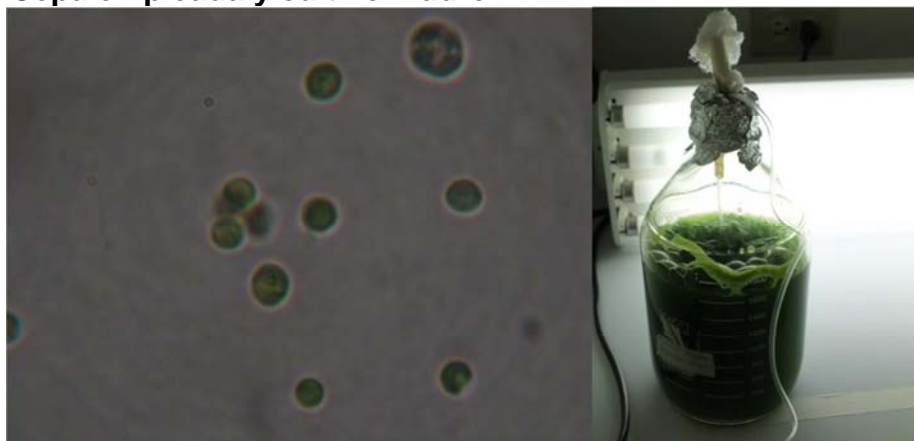
posteriormente conforme aumentaba la biomasa se escaló hasta llegar a un recipiente de 2 L como se mencionó anteriormente.

**Figura 1 Medición de iluminancia**



Fotografía izquierda: Medición de intensidad de luz. Fotografía derecha: Luxómetro Digital Exttech.

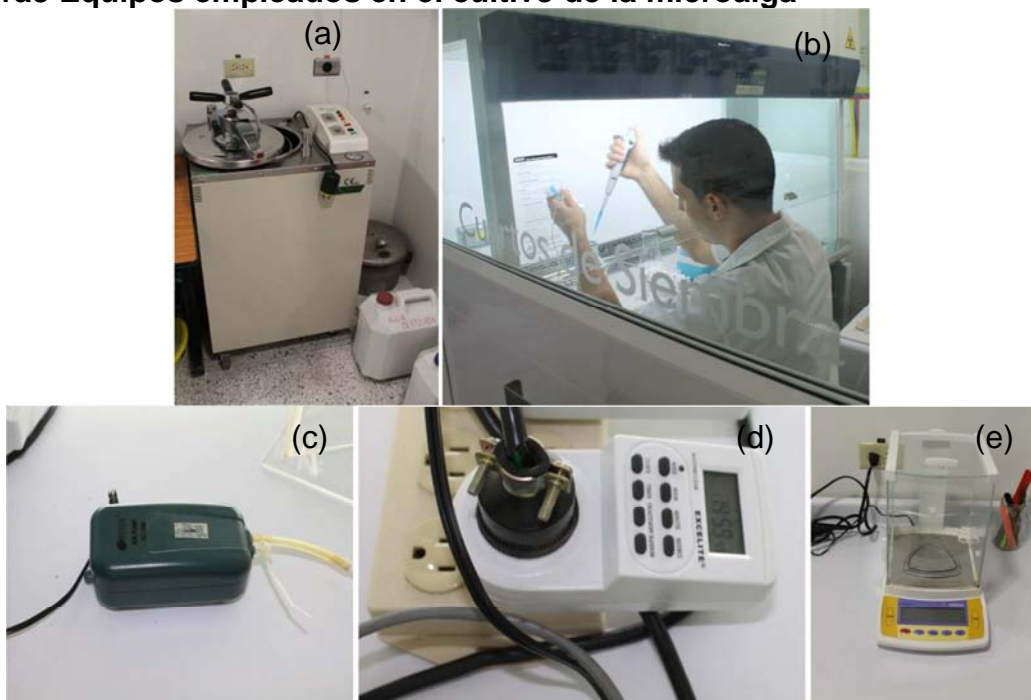
**Figura 2 Cepa empleada y cultivo madre**



Fotografía izquierda: Células de *Chlorella* sp. Fotografía derecha: Cultivo madre.

Tanto el material empleado como los medios de cultivo fueron auto clavados a 128°C y 1,5 atm para garantizar las condiciones asépticas durante todos los ensayos, la cabina de flujo laminar se utilizó durante toda la investigación para la toma de muestras en los cultivos. La autoclave empleada para dicho proceso y los demás equipos empleados en el cultivo se muestran en la Figura. 3.

**Figura3 Equipos empleados en el cultivo de la microalga**



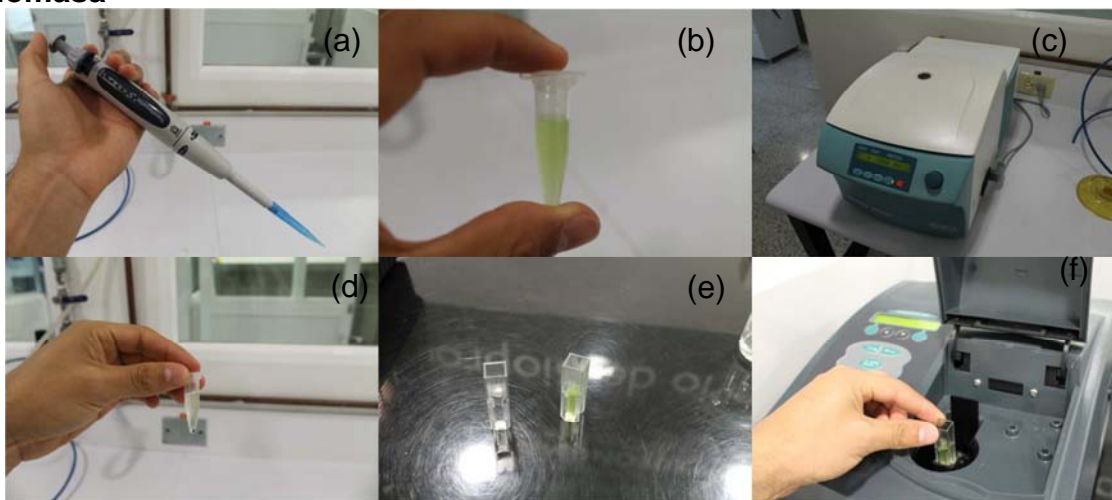
Fotografía(a): Autoclave Sterilizer Sturdy SA-300VF. Fotografía (b): Cabina de flujo laminar. Fotografía (c): Bomba de aire. Fotografía (d): Timer Digital Excelite. Fotografía (e): Balanza Analítica Satorius.

**5.1.2. Determinación de biomasa y otros parámetros.** La determinación de concentración de biomasa en los diferentes medios de cultivo fue realizada a través de una curva de calibración de acuerdo con la metodología sugerida por el profesor Godfrey Idrobo Libreros de la Universidad del Valle. Esta fue efectuada resuspendiendo la biomasa en agua des ionizada para de esta forma minimizar las posibles interferencias ocasionadas por los medios de cultivo. Para la realización de la curva inicialmente se tomó una muestra de 12 mL del cultivo madre y se lavó la biomasa centrifugándola 3 veces a 5000 rpm durante 10 min descartando el sobrenadante, una vez fue lavada la biomasa se re suspendió nuevamente en agua des ionizada con el mismo volumen (12 mL). Posteriormente se determinó la concentración a la que se encontraba dicha muestra por gravimetría de peso seco por filtración al vacío<sup>69</sup>. Una vez conocida su concentración se llevó a una concentración de 2 g/L para efectos prácticos, posteriormente se realizaron las diluciones patrones correspondientes partiendo de una concentración de 0,02 g/L hasta llegar a 0,9 g/L para su posterior lectura a 760 nm.

<sup>69</sup>APHA, AWWA, APLF. Métodos normalizados para análisis de aguas y aguas residuales. Edición 17. American Public Health Association Enc. New York 1992.

Para la determinación de biomasa en todos los ensayos se tomó 1 mL de muestra por medio de una micro pipeta y se realizó su correspondiente lectura en el espectrofotómetro a 760 nm, esto después de centrifugar la muestra a 5000 rpm durante 10 min descartar el sobrenadante y resuspender nuevamente en agua des ionizada. La metodología y equipos utilizados para determinar la biomasa se muestran en la Figura 4.

**Figura 4 Metodología y equipos empleados para la determinación de biomasa**



Fotografía (a): Micro pipeta. Fotografía (b): Eppendorf con muestra de cultivo.

Fotografía (c): Centrifuga Mikro 200R. Fotografía (d): Biomasa centrifugada.

Fotografía (e): Celdas. Fotografía (f): Espectrofotómetro visible Genesys.

Las tasas específicas de crecimiento y productividad fueron calculadas de acuerdo a las ecuaciones (2) y (3) respectivamente. La determinación de los parámetros físico químicos del agua residual se llevaron a cabo según lo establecido por los procedimientos establecidos en el Manual de Análisis de Agua de la compañía Hach Company<sup>70</sup>. El espectrofotómetro y las celdas utilizados para la caracterización se muestran en la Figura 5.

<sup>70</sup> HACH COMPANY. Manual de Análisis de Agua. 2da Edición. Loveland, Colorado. EEUU. 2000, p. 209.

**Figura 5 Equipos empleados para la caracterización del agua residual**



**5.1.3. Selección del medio de cultivo estándar.** Para determinar el medio sintético más adecuado para el crecimiento óptimo de la microalga, esta se sometió a dos medios de cultivo; el medio Sorokin & Krauss (S&K) y el Medio Basal de Bold (BBM). De esta forma se realizaron 2 tratamientos por triplicado, obteniendo un total de 6 cultivos (3 con el BBM y 3 con el medio S&K). En la Figura 6 se muestran los 6 cultivos.

**Figura 6 Cultivos con los medios BBM y S&K**



El montaje de los experimentos se realizó con un inóculo de 0,05 g/L en frascos boeco de 500 mL previamente esterilizados, con un volumen nominal de 350 mL de los medios BBM y S&K, agitados por burbujeo a través de un sistema de bombeo de aire desde el fondo del frasco como se explicó anteriormente. Los cultivos estuvieron bajo iluminación constante a través de 4 lámparas Cool White suministrando 650 Flux. El ensayo se realizó durante 14 días por triplicado, solo los promedios obtenidos de los triplicados son presentados con sus respectivas desviaciones estándar.

**5.1.4. Ensayo con agua residual.** Para el ensayo utilizando el agua residual como medio de cultivo, se tomó una muestra puntual de 3 L en un recipiente plástico, del efluente final de la PTAR de la UAO, a las 8:15 a.m. el día 28 de abril del 2014. La muestra fue recolectada de la parte superficial del tanque No 3 donde es almacenada para verterla finalmente a una acequia. El tanque presenta una mínima agitación debido a la caída del agua residual. Una vez tomada la muestra se llevó de inmediato al Laboratorio de Ambiental de la Universidad para su análisis y utilización en el experimento. Los parámetros y métodos utilizados en la caracterización del agua residual se muestran en la siguiente tabla.

**Cuadro 3 Parámetros y métodos utilizados en la caracterización del agua residual doméstica**

Parámetro	Método de medición
Oxígeno Disuelto (OD)	Luminiscencia – HACH 10230
Sólidos Disueltos Totales (SDT)	Potenciométrico – HACH sesion5
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	Espectrofotométrico – SMEWW 5220 D
Nitratos ( $\text{NO}_3$ )	Espectrofotométrico – HACH 8039
Nitratos ( $\text{NO}_3\text{-N}$ )	Espectrofotométrico – HACH 8039
Fosfatos ( $\text{PO}_4$ )	Espectrofotométrico – HACH 8048
Fósforo Total(P)	Espectrofotométrico – HACH 8048
Ortofosfatos ( $\text{P}_2\text{O}_5$ )	Espectrofotométrico – HACH 8048
Sulfatos ( $\text{SO}_4$ )	Espectrofotométrico – HACH 8051
Hierro Total	Espectrofotométrico – HACH 8008
Manganeso total	Espectrofotométrico – HACH 8034
Cobre Total	Espectrofotométrico – HACH 8506
Cloro Total	Espectrofotométrico – HACH 10070
Cloro libre	Espectrofotométrico – HACH 10069
Amoniaco	Espectrofotométrico – HACH 8155
pH	Potenciométrico – SMEWW 4500-H <sub>+</sub>



### Cuadro 3 Parámetros y métodos utilizados en la caracterización del agua residual doméstica (Continuación)

Parámetro	Método de medición
Conductividad (uS/cm)	Potenciométrico – SMEWW 2510
Salinidad (%.)	Potenciométrico – SMEWW 2520

Para el cultivo en el agua residual se realizaron 2 tratamientos, el primero fue esterilizar el agua residual (ARA) y el segundo filtrar el agua a través de un filtro de 5  $\mu$ m y posteriormente esterilizarla (ARAF). El cultivo con el agua residual se llevó a cabo en frascos boeco de 500 mL previamente esterilizados, teniendo un volumen de trabajo de 350 mL por triplicado, de forma que se montaron 6 cultivos (3 para el primer tratamiento y 3 para el segundo tratamiento) teniendo un inóculo de 0,05g/L. Los cultivos se mantuvieron bajo iluminación constante a 650 Lux a una temperatura de 25 °C. Se tomó 1 mL de muestra de los cultivos cada 24 horas desde la hora de siembra durante 14 días, para la determinación de biomasa por medio de la curva de calibración, como se describió en el capítulo 5.1.2. Los 6 cultivos se muestran en la figura 7.

**Figura7 Cultivos en el agua residual doméstica**



**5.1.5. Ensayo de remoción y crecimiento.** Este experimento se llevó a cabo utilizando como medio de cultivo el agua residual de la UAO, en frascos Boeco de 1L teniendo un volumen nominal de 900 mL. Para esto se tomó una muestra de 3 L del efluente final, de la PTAR de la misma forma como se realizó en el anterior ensayo. Se inoculó a 0,05 g/L y se tomó cada 3 días durante 9 días, una muestra de 23 mL para la determinación de concentración de biomasa, nitrato y DQO. Este ensayo se realizó por duplicado y adicionalmente se montó un blanco, el cual consistió en un reactor bajo las mismas condiciones pero sin la microalga, en este



se evaluó la remoción de nitrato y DQO por factores físico-químicos. Los 3 cultivos se muestran en la figura 8.

**Figura 8** Fotobioreactores en lote con agua residual doméstica



**5.1.6. Ensayo con adición de carbono.** Con el objetivo de evaluar si el carbono fue un factor limitante en el crecimiento de la cepa en los ensayos con los medios sintéticos y de esta forma corroborar que la adición de carbono incrementa la productividad de biomasa, se cultivó la microalga en el BBM adicionando 2 concentraciones diferentes de carbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ); 0,5 (C1) y 0,1 g/L(C2). Se seleccionó el medio BBM debido a que demostró ser el medio más eficiente bajo las condiciones de cultivo realizadas, es decir, generó la mayor cantidad de biomasa con la menor cantidad de nutrientes. Debido a que la adición de carbonato de sodio aumentó el pH de los medios, se adicionó ácido sulfúrico para ajustar el pH a neutro. Adicionalmente con el propósito de verificar el consumo de materia orgánica por parte de la microalga y que el desarrollo del metabolismo mixotrófico mejora los rendimientos de producción de biomasa, se cultivó en el BBM adicionando 2 concentraciones diferentes de glucosa ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) con base en las concentraciones de DQO que se podría presentar en un agua residual doméstica, las cuales fueron 0,5 (C3) y 0,1 g/L (C3).

Los ensayos fueron llevados a cabo en boecos de 500 mL con 350 mL de solución, a 25 °C con una intensidad de luz de 650 Lux. Los fotobioreactores fueron agitados por burbujeo, de igual forma que en el ensayo con los medios sintéticos. Los tratamientos fueron realizados por duplicado debido a la limitación de espacio y materiales para el montaje de los cultivos, como cultivo de referencia se cultivó la microalga nuevamente en el BBM. En la figura 9 se muestran los 9 cultivos (2 cultivos con C1, 2 con C2, 2 con C3, 2 con C4 y el blanco en el BBM). Cada 24 horas a partir de la hora de siembra se tomó 1 mL de muestra de cada cultivo para cuantificar la biomasa a través de la curva de calibración realizada.

Figura 9 Cultivos de *Chlorella* con adición de carbonoinorgánico y orgánico



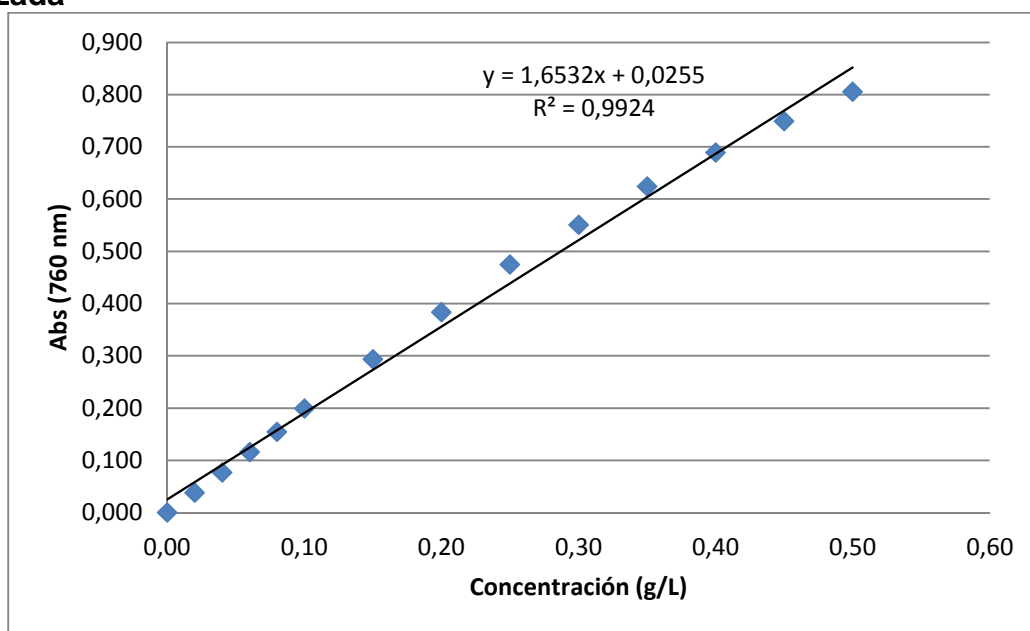
## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. CURVA DE CALIBRACIÓN

La gráfica con los datos de correlación entre absorbancia y concentración de biomasa se muestran en la Figura 10. En esta gráfica se tomaron como válidos los valores obtenidos desde 0 hasta una concentración de 0,5 g/L. porque este segmento presentó el mejor comportamiento estadísticamente, teniendo un valor de “r” mayor a 0,98 y un valor relativamente pequeño de “b”.

El rango de medición de la curva de calibración permitió de esta forma medir sin necesidad de diluir la muestra hasta una concentración de 0,5 g/L, el cual es un rango bastante amplio si se tiene en cuenta que las curvas de calibración se utilizan principalmente en rangos pequeños.

**Figura 10** Curva de calibración de biomasa de *Chlorella sp* en agua desionizada

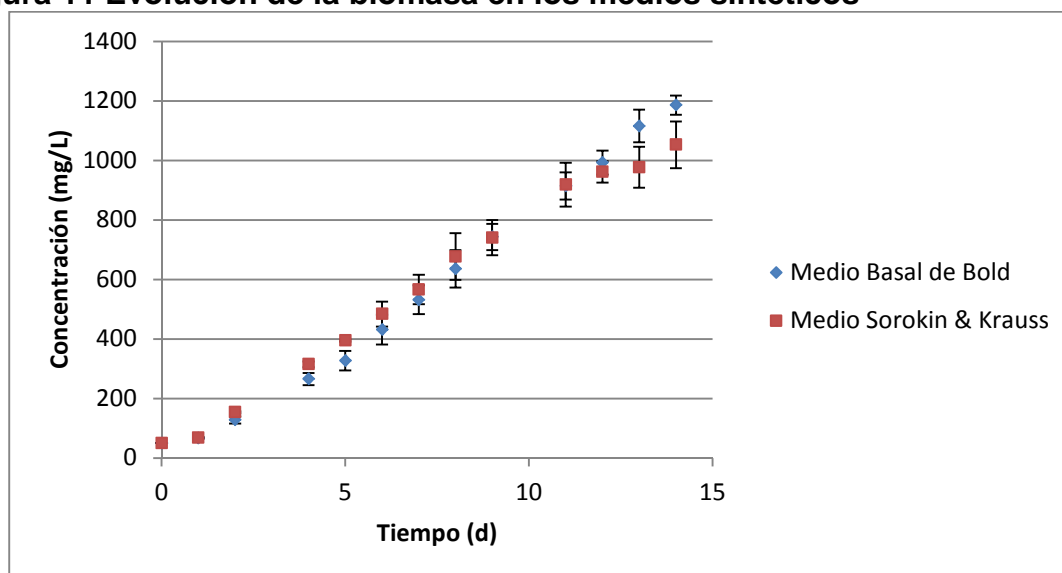


### 6.2. SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO ESTANDAR

Las curvas de crecimiento de la microalga *Chlorella sp.* obtenidas en los dos medios sintéticos de cultivo se muestran en la Figura 11. En esta se observa un

comportamiento lineal en el crecimiento de la microalga entre el día 2 y el día 11, con una fase de retardo de aproximadamente 24 horas para ambos medios en el primer día de cultivo. Por otra parte se puede apreciar que la microalga presentó un mejor crecimiento en el medio S&K desde las 72 hasta las 216 horas de cultivo aproximadamente. En relación al BBM, no tuvo una diferencia significativa con el otro medio entre las 72 y 216 horas de cultivo. A partir de este tiempo la microalga presentó un mejor crecimiento en el BBM terminando con una concentración final de un 11,26% mayor a la del medio S&K.

**Figura 11 Evolución de la biomasa en los medios sintéticos**



Los coeficientes y parámetros de crecimiento determinados para la microalga estudiada se presentan en la Cuadro4 y fueron obtenidos a partir del día 11 de cultivo. De acuerdo con la ANOVA realizado con una significancia del 95% a los parámetros de crecimiento mostrados en la tabla, no existen diferencias significativas entre tratamientos, es decir, la microalga no presentó un crecimiento significativamente diferente entre los dos medios de cultivo estudiados, esto sugiere que los requerimientos nutricionales de la microalga fueron efectivamente cubiertos por los medios de cultivo, significando esto que ambos no presentan nutrientes limitantes.

**Cuadro4 Resumen datos de crecimiento medios sintéticos**

Medio de cultivo	Tasa de crecimiento (d <sup>-1</sup> )	Productividad (mg/L*d)	Concentración final (mg/L)
BBM	0,264	81,1	1185,72
S&K	0,264	71,6	1052,63

A pesar de que el medio S&K tiene una concentración 10 veces mayor en micronutrientes y una concentración 5 veces mayor de nitrógeno que el medio BBM (ver Cuadro5), este factor no influyó en el crecimiento de la microalga. Caso contrario se presentó en un estudio realizado por Idrobo, G.; Florez, L. y Lopez, J. en el año 2012, en el cual utilizaron como medio de cultivo los medios S&K y BBM para el crecimiento de la misma cepa (*Chlorella sp.* CM1), obteniendo mejores tasas de crecimiento en el medio S&K, sin embargo, las condiciones de cultivo no fueron las mismas.

**Cuadro 5 Composición de los Medios Basal de Bold y Sorokin & Krauss**

Compuesto	Concentración (mg/L)	
	BBM	S&K
NaNO <sub>3</sub>	250	
KNO <sub>3</sub>		1250
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	25	40
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	75	1000
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	75	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	175	1250
NaCl	25	
EDTA	50	500
KOH	31	
FeSO <sub>4</sub>	4,98	50
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	0,01142	0,114
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,00882	0,088
MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	0,00144	0,014
MoO <sub>3</sub> *4H <sub>2</sub> O	0,00071	0,007
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0,00157	0,016
Co(NO <sub>3</sub> )*6H <sub>2</sub> O	0,00049	0,005

Por otro lado se observa que las tasas de crecimiento reportadas en los diferentes estudios con *Chlorella sp.* varían significativamente en función de las condiciones de cultivo, teniendo valores desde 0,183 hasta 0,948 d<sup>-1</sup>, de igual forma sucede para las productividades volumétricas, donde se registran datos desde 60 hasta 400 mg/L\*d (ver Cuadro 1), rangos entre los cuales se encuentran los resultados obtenidos en el presente estudio.

Al comparar las tasas de crecimiento y productividades volumétricas obtenidas en el presente estudio con la literatura (Cuadro 1), se observa que son valores relativamente bajos, esto se le puede atribuir inicialmente a que uno de los principales factores que influye en el crecimiento de las microalgas es el

suministro de una fuente adicional de carbono, ya sea orgánica o inorgánica. Esta fuente se adicionó en el presente estudio para ambos medios con el aire atmosférico el cual posee una fracción muy pequeña de  $\text{CO}_2$ , caso contrario a los estudios referenciados en la Cuadro 1, donde se enriquece con  $\text{CO}_2$  el aire bombeado a los reactores, variando desde un 5 a un 12%. Sin esta fuente de carbono, según la ley del mínimo de Liebig, sin importar la concentración de los demás nutrientes la microalga no sería capaz de metabolizar de forma adecuada los demás macro y micro nutrientes. En este orden de ideas, el carbono muy posiblemente fue el principal factor limitante en el crecimiento de la microalga y por lo tanto el responsable de no encontrar diferencias significativas entre los dos tratamientos realizados.

Otro factor que se observó en el cultivo de la microalga en los dos medios sintéticos, fue la generación de espuma, la cual se produjo en mayor medida en el medio S&K, dicha observación se hizo claramente diferente en los medios a partir del día 5 de cultivo. La generación de espuma sugiere una mayor síntesis de proteínas por parte de la microalga en el medio S&K, lo cual concuerda con la literatura ya que se ha observado que los medios con mayor concentración de N inducen una mayor producción de proteínas por parte de las microalgas, indicando que si bien no se obtuvo un diferencial en la producción de biomasa en los medios de cultivo, la composición de estos si influye de forma directa en la composición química de la microalga. Sin embargo, para hacer válida dicha afirmación sería necesario realizar la caracterización química de la biomasa.

Otra singularidad encontrada en el medio S&K, es la tendencia de la biomasa a adherirse a las paredes del recipiente en la parte superior de éste, es decir, en la parte que no hay medio de cultivo. Esto es un factor a tener en cuenta, ya que después de determinado tiempo, la biomasa se adhiere de tal forma que se hace imposible su re-suspensión en el medio, por lo cual esta biomasa que se está generando no es posible cuantificarla.

### **6.3. CRECIMIENTO EN EL AGUA RESIDUAL DOMÉSTICA**

Teniendo en cuenta la caracterización del agua residual realizada (Cuadro6), se puede observar en primera instancia, que esta si bien contiene una DQO relativamente baja, tiene una concentración alta de sólidos disueltos totales (SDT), sin embargo, este hecho se puede deber en gran medida a la descomposición de la materia orgánica en iones como el  $\text{NO}_3^-$  y el  $\text{S}^{2-}$ , hecho que explicaría también, la presencia de nitratos y sulfatos, el nitrato además es producido en la oxidación del  $\text{NH}_3$  por parte de las bacterias. La presencia de fosfatos y ortofósforos es común en las aguas residuales debido al uso de detergentes, estos compuestos

rara vez son removidos por los tratamientos convencionales, por eso es normal encontrarlos en el efluente de la PTAR. Por otro lado, se encontraron trazas de Fe, Cr, Mn, Cl y Cu los cuales se encuentran de manera natural en las aguas superficiales y los tratamientos convencionales normalmente no eliminan dichos compuestos o no en su totalidad, por esta razón fácilmente terminan en el agua potable y por ende, posteriormente en las aguas residuales. En cuanto al amoníaco se puede afirmar que la concentración determinada corresponde a la de un agua residual fuerte, este parámetro está íntimamente relacionado con el olor del agua residual, el cual poseía un leve olor amoniacal, el valor elevado encontrado podría deberse a un alto aporte en el afluente de la PTAR o a un ineficaz funcionamiento del reactor. Finalmente muy asociado y en concordancia con los valores determinados para nitratos, fosfatos y ortofósforos, el valor de la conductividad verificó la presencia de sales disueltas en el agua residual, presentando un valor relativamente bajo, debido a las bajas concentraciones de dichos iones<sup>71</sup>.

Las concentraciones de macronutrientes entre el agua residual y el BBM presentan una variación importante, mostrando valores de hasta 40 veces mayor en el BBM, siendo este el caso del nitrato, sin embargo, en el agua residual la predominancia de nitrógeno fue en forma de amoníaco, el cual presentó un valor alto (>50 mg/L). Es de esta forma que la cantidad de nitrógeno en el BBM fue aproximadamente entre 4 a 5 veces mayor que en el agua residual. Los sulfatos por otro lado presentan valores de hasta 10 veces más en el BBM. La diferencia más significativa muy posiblemente la presenten los ortofósforos los cuales tuvieron un valor 55 veces mayor en el BBM. La concentración de todos los micronutrientes en el agua residual no se logró determinar, sin embargo, si se lograron determinar algunos. Entre los más importantes, el hierro, el cual fue mayor en el BBM, siendo aproximadamente 3 veces mayor. Caso contrario, el manganeso presentó una concentración del orden de 500 veces mayor en el agua residual, de igual forma el cobre fue cerca de 100 veces mayor. El pH del agua residual fue mayor al del BBM, sin embargo, es un valor cercano al neutro (7,43), teniendo en cuenta además que los cultivos de microalgas tienden a subir el pH del medio hasta valores de 9 o incluso 11, por lo cual la interferencia en el crecimiento de la microalga por el pH fue mínima o nula. Finalmente la principal diferencia entre el agua residual y el BBM la marcó la materia orgánica, la cual según la DQO presentó un valor significativo, mientras que en el BBM no hay suministro de materia orgánica u otra fuente de carbono.

Es entonces como la caracterización del agua residual permite visualizar que esta podría considerarse como una fuente importante de micronutrientes y que además

---

<sup>71</sup> METCALF & EDDY. Ingeniería de aguas residuales. 3 ed. España: McGraw-Hill, 1995. Volumen 1.

aporta todos los macronutrientes para el crecimiento autotrófico, sin embargo, en concentraciones muy bajas. No obstante el crecimiento de las microalgas en aguas residuales ha comprobado ser mixotrófico, por lo cual no solamente utilizan las sales inorgánicas presentes sino también la materia orgánica disponible que no se haya alcanzado a degradar totalmente durante el tratamiento del agua residual, en este sentido el valor de la DQO señala que todavía existe una cantidad apreciable de materia orgánica que muy posiblemente no estuvo totalmente estabilizada.

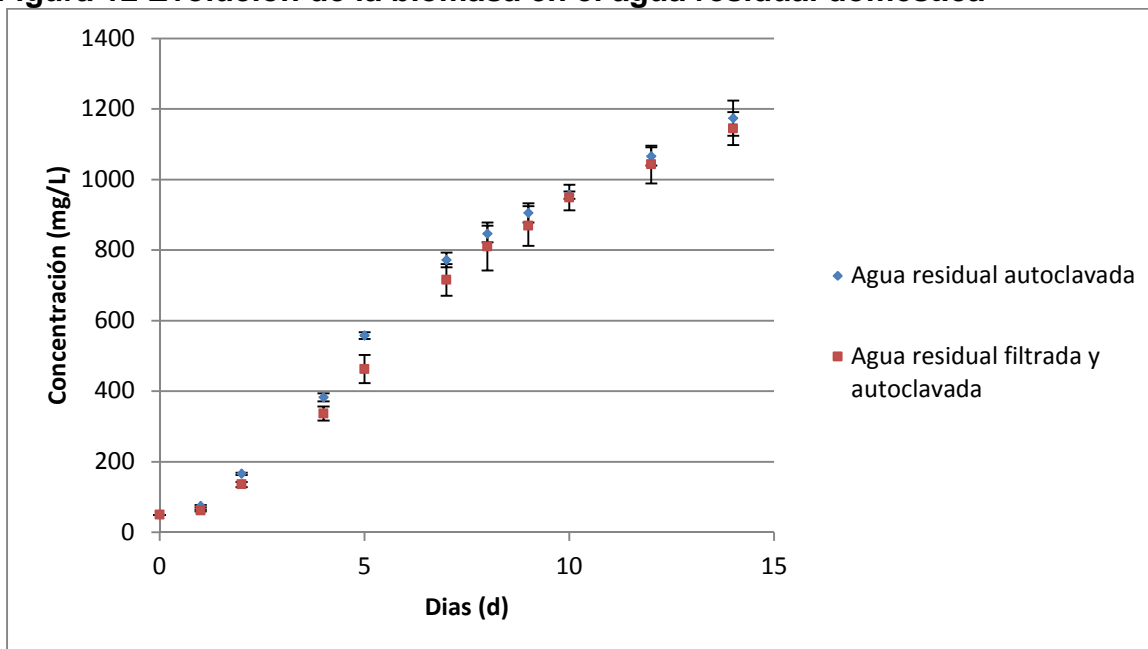
**Cuadro 6 Caracterización del agua residual doméstica de la UAO**

Parámetro	Concentración (mg/L)
Oxígeno Disuelto (OD)	5,85
Sólidos Disueltos Totales (SDT)	574,00
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	112,00
Nitratos (NO <sub>3</sub> )	6,00
Nitratos (NO <sub>3</sub> -N)	1,40
Fosfatos (PO <sub>4</sub> )	6,00
Fósforo Total(P)	1,95
Ortofosfatos (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	4,50
Sulfatos (SO <sub>4</sub> )	8,00
Hierro Total	1,90
Manganeso total	0,70
Cobre Total	0,16
Cloro Total	0,13
Cloro libre	0,11
Amoniaco	>50
pH	7,43
Conductividad (uS/cm)	1164,00
Salinidad (%.)	0,60

El crecimiento de la microalga *Chlorella sp.* en el agua residual doméstica de la UAO se presenta en la Figura12, donde se puede observar que la microalga tuvo una fase de retardo de 24 horas en ambos tratamientos, para después comenzar su crecimiento exponencial. Dicho crecimiento se dio durante los posteriores 13 días del experimento. Aunque el crecimiento de la microalga en el agua auto clavada inicialmente presentó un mayor crecimiento en comparación con el agua residual filtrada, no es posible observar una diferencia significativa en su crecimiento.



**Figura 12 Evolución de la biomasa en el agua residual doméstica**



En la Cuadro 7 se presentan los parámetros de crecimiento determinados para el día 10 de cultivo para la microalga en ambos tratamientos. El ANOVA realizado para los datos determinó que no existieron diferencias significativas entre tratamientos, por lo cual se descarta que el proceso de filtración del agua residual influya en el crecimiento de la microalga, razón por la cual se hace innecesario este proceso, si bien es un proceso que permite medir posteriormente con mayor exactitud la concentración de la biomasa por peso seco, la utilización de curvas de calibración es un procedimiento mucho más rápido y práctico para dicho objetivo.

**Cuadro 7 Resumen datos de crecimiento en el agua residual**

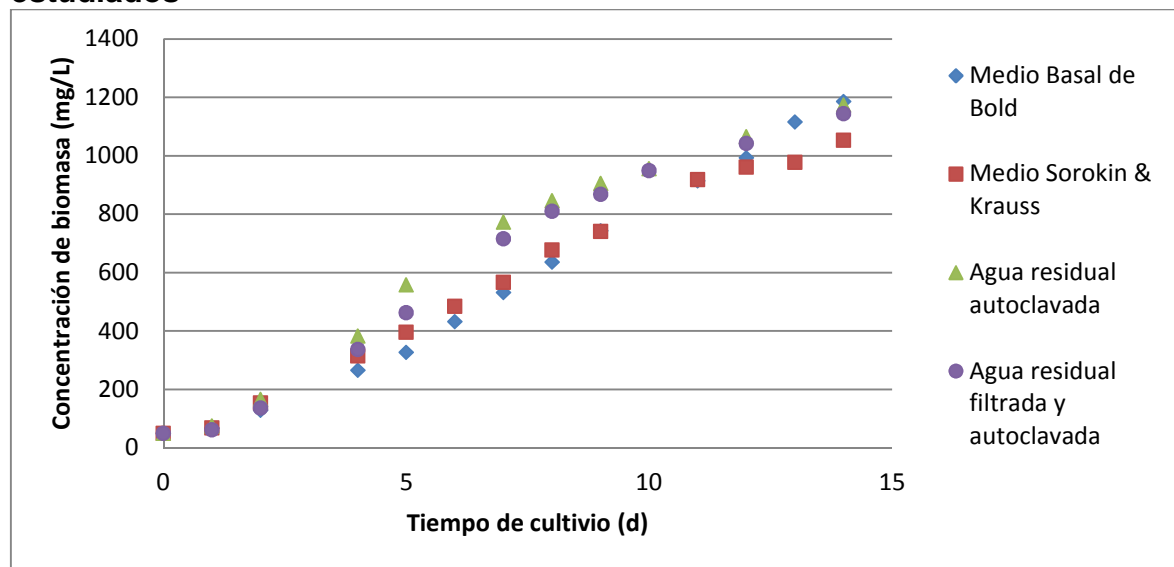
Medio de cultivo	Tasa de crecimiento (d <sup>-1</sup> )	Productividad (mg/L*d)	Concentración final (mg/L)
Agua residual auto clavada	0,295	90,58	1173,62
Agua residual filtrada y auto clavada	0,294	89,86	1143,98

Una de las razones por las cuales el proceso de filtración del agua residual muy posiblemente no afectó el crecimiento de la microalga es debido a que el efluente ya había pasado a través de un filtro en medio granular como parte de su tratamiento, eliminando de esta forma en gran parte los sólidos en suspensión que no fueron removidos en el proceso de sedimentación secundaria, teniendo en

cuenta además que la gran mayoría de partículas suspendidas en el efluente de un tratamiento secundario tiene un tamaño de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , los cuales son eliminados por medio del filtro. La principal posible implicación de las partículas suspendidas en el crecimiento de las microalgas es la dispersión de la luz, sin embargo debido a su bajo contenido en efluente este factor no generó mayor impacto.

En relación con el crecimiento en los medios sintéticos, el ANOVA realizado a los parámetros de crecimiento entre los 4 tratamientos realizados (BBM, S&K, ARA y ARAF) a la microalga, se encontró que existieron diferencias significativas entre los medios sintéticos (ver Cuadro 3) y los medios naturales (ver Cuadro 7), presentando un mejor crecimiento en los medios naturales (productividades y tasas de crecimiento 11,7% mayores en el agua residual auto clavada en comparación con el BBM). Este resultado ratifica que el crecimiento mixotrófico que se presenta al cultivar la microalga en aguas residuales potencia la generación de biomasa al no depender de la presencia de luz para su reproducción. En la Figura14 se puede observar la evolución de la biomasa en los diferentes medios de cultivo a lo largo de los 14 días de los experimentos.

**Figura 13 Crecimiento de *Chlorella sp.* en los diferentes medios de cultivo estudiados**



Al comparar los parámetros de crecimiento obtenidos junto con otros estudios de crecimiento de *Chlorella* en aguas residuales, se observa que estos son relativamente bajos, sin embargo, al analizar la caracterización de las aguas residuales empleadas en dichos estudios se observan concentraciones

significativamente mayores de nitrógeno y DQO en comparación con la caracterización realizada al agua residual de la UAO, factores claves en el crecimiento de las microalgas. La no adición de una fuente de carbono inorgánica también pudo haber jugado un rol importante en el crecimiento de la microalga. No obstante la comparación de parámetros de crecimiento entre estudios se hace compleja debido a que existen diferentes métodos de medición de biomasa y de cálculo de dichos parámetros, tomando además diferentes tiempos, lo cual puede generar ruido en los resultados obtenidos.

Por otro lado, cabe resaltar que la coloración que desarrolló la microalga en los cultivos sintéticos fue de un color verde intenso, mientras que en los medios naturales fue un verde suave, a pesar de tener concentraciones de biomasa muy similares, este hecho podría sugerir que la biomasa tuvo una tendencia a generar más clorofila en los medios sintéticos que en los medios naturales, sin embargo debido a que no se realizó la caracterización de la biomasa no es posible hacer dicha afirmación con total certeza.

#### **6.4. EVALUACIÓN EN LA REMOCIÓN DE NITRATO Y DQO**

En el presente ensayo se observó una disminución en la concentración de nitrato en el agua residual en los reactores inoculados con la microalga, verificando de esta forma la capacidad de las microalgas de tomar los nutrientes contenidos en las aguas residuales para su metabolismo y de esta forma emplearse como un tratamiento avanzado. El mayor porcentaje de remoción de nitrato obtenido por parte de la microalga se logró en el tercer día de cultivo (ver Cuadro8), donde la concentración de éste en el blanco, es decir el reactor sin la microalga, obtuvo un valor de 45 mg/L y el valor promedio de los reactores con la microalga presentó un valor de 15,5 mg/L. Para los días 6 y 9 de cultivo se logró una remoción inferior a la del tercer día, esto debido a dos factores, la concentración de nitrato en el blanco también descendió y la concentración en los reactores con la microalga fue mayor en relación con el tercer día. Es de esta forma como la concentración de nitrato en el blanco descendió de 45 mg/L en el tercer día a 33 mg/L para el noveno día, evidenciando de esta forma que algunos factores físicos y/o químicos también están involucrados en la eliminación del nitrato de las aguas residuales. En los reactores con la microalga el nitrato presentó valores promedio de 15,5, 20,25 y 18,13 mg/L para los días tercero, sexto y noveno respectivamente, presentándose de esta forma un fenómeno interesante en el cual la microalga inicialmente asimiló nitrato, para después expulsarlo al medio y volverlo a consumir. El aumento de la concentración de nitrato en el medio pudo deberse también a la descomposición de la materia orgánica.

#### Cuadro 8 Remoción de Nitrato y DQO por parte de la microalga *Chlorella* sp.

Día	Porcentaje de remoción		
	Nitrato (NO <sub>3</sub> )	Nitrato (N-NO <sub>3</sub> )	DQO
3	65,56	65,85	15,38
6	48,73	48,61	-605,00
9	45,08	45	-600

Aunque las tasas de remoción de nitrógeno alcanzados con *Chlorella* han variado significativamente a lo largo de los diferentes estudios realizados (ver Cuadro 2), las remociones encontradas en el presente estudio son comparables a la de dichos estudios, presentando una alta tasa teniendo en cuenta que para el tercer día alcanzo una remoción del 65,56%, siendo esta una de los mayores porcentajes de remoción encontradas para *Chlorella*.

Por otro lado se presentó un fenómeno particular con la DQO, ya que inicialmente la microalga removió una pequeña fracción de esta para después incrementarla 60 veces el valor del blanco. La concentración de la DQO en el blanco se mantuvo aproximadamente constante presentando un valor de 13 mg/L para el tercer día y se estabilizó en 10 mg/L a partir del día 6, mientras que en los reactores con la microalga presentó un valor promedio de 11 mg/L en el día 3 de cultivo y aumentó a 70 mg/L en el sexto día estabilizándose en este valor. Cabe resaltar que la concentración de la DQO del agua residual presentó un valor relativamente bajo, lo cual muy probablemente indique que la materia orgánica contenida en esta se encontró mayormente estabilizada, en este orden de ideas, no existió materia orgánica disponible para el consumo de la microalga, razón por la cual el metabolismo heterotrófico de la microalga no se logró desarrollar en el experimento, este hecho se vio reflejado en el bajo crecimiento, obteniendo una tasa específica de crecimiento de 0,224 d<sup>-1</sup>, siendo esta la más baja alcanzada durante todos los ensayos realizados. El aumento de la DQO en los reactores con la microalga muy probablemente se debió a la expulsión de azúcares al medio, los cuales son subproductos de la fotosíntesis<sup>72</sup>.

#### 6.5. EVALUACIÓN DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA CON ADICIÓN DE CARBONO

El enriquecimiento del BBM con carbono a diferentes concentraciones generó un crecimiento diferencial entre los diferentes tratamientos, destacando el crecimiento

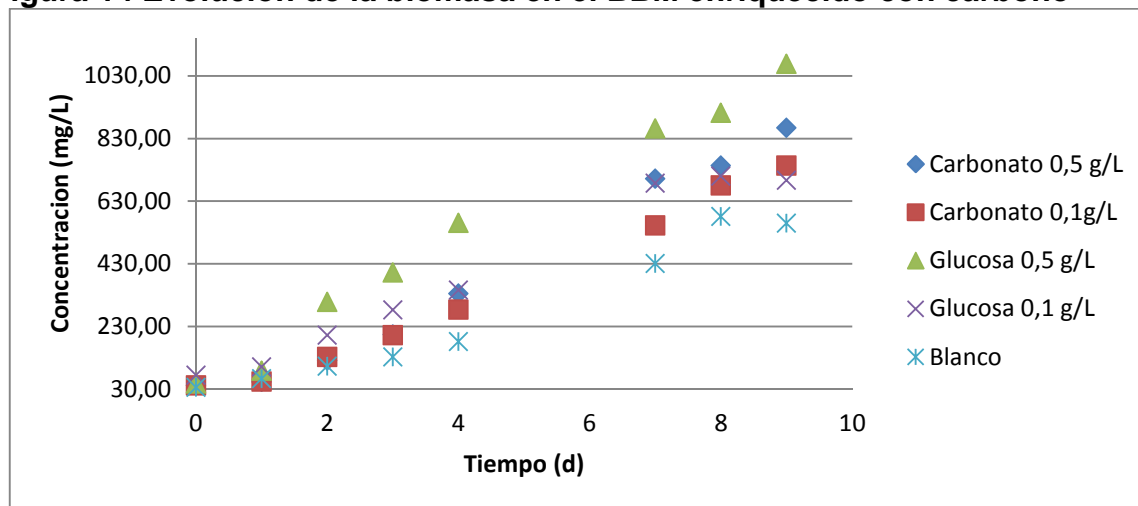
<sup>72</sup>Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. Op. Cit; p. 8.

en el cultivo con mayor concentración de glucosa, el cual siempre presentó la mayor concentración de biomasa durante los 9 días de cultivo. Todos los cultivos presentaron una fase de retardo de aproximadamente 24 horas para posteriormente iniciar el crecimiento exponencial el cual se presentó durante todo el ensayo a excepción de un cultivo. La fase de retardo se debió muy probablemente debido al cambio en las condiciones de cultivo, ya que se cambiaron condiciones importantes tales como iluminación y pH. Los cultivos con carbonato de sodio presentaron un mejor crecimiento en relación al blanco (ver Figura14) alcanzando concentraciones significativamente mayores a las alcanzadas por dicho cultivo. El cultivo con glucosa a 0,1 g/L presentó una inhibición en su crecimiento tras alcanzar el séptimo día de cultivo.

Al analizar los parámetros de crecimiento de la cepa entre los diferentes tratamientos (ver Cuadro9) se observa que acorde con la Figura14 las mayores tasas de crecimiento fueron alcanzadas por los cultivos C1 y C3, sin presentar una diferencia significativa entre ambos. La menor tasa de crecimiento la presentó el cultivo C4 al presentar una inhibición en su crecimiento. Sin embargo, la menor productividad la presentó el blanco siendo la productividad más baja alcanzada en todos los ensayos. El ANOVA realizado a las tasas de crecimiento presentadas en la Cuadro 8, demostró que existieron diferencias significativas entre el blanco y los tratamientos C1, C3 y C4, presentado un comportamiento similar con el tratamiento C2. Sin embargo, este comportamiento no se replicó de igual forma con la productividad, ya que el ANOVA arrojó que el blanco obtuvo diferencias significativas con C1 y C3.

Al comparar las productividades y tasas de crecimiento entre los tratamientos C1 y C2 con las obtenidas en el blanco, se observa que la tasa de crecimiento en el tratamiento C2 no es significativamente mayor que en el blanco, sin embargo, la productividad si, implicando esto que la adición de 0,1 g/L de carbonato de sodio no indujo un mayor número de divisiones celulares pero generó una cantidad mayor significativa de biomasa (33,7% mayor), este hecho está relacionado con la predominancia en la generación de determinados compuestos por la microalga. En el caso del tratamiento C1, las productividades y tasas de crecimiento fueron significativamente mayores a las obtenidas en el blanco, presentando una productividad y tasa de crecimiento 57,0 y 9,6% mayor respectivamente. El crecimiento mixotrófico estimulado con la adición de 0,5 g/L de glucosa, por otro lado, presentó tasas de crecimiento y productividades 11,9 y 94,6% respectivamente mayores a las obtenidas con el blanco. Finalmente a pesar de la inhibición que demostró el tratamiento C4 no exhibió diferencias significativas en la productividad en relación al blanco, caso contrario, la tasa de crecimiento del blanco fue significativamente mayor a la del tratamiento.

**Figura 14 Evolución de la biomasa en el BBM enriquecido con carbono**



**Cuadro 9 Parámetros de crecimiento de *Chlorella* bajo diferentes concentraciones de carbono inorgánico y orgánico**

Medio de cultivo	Blanco	C1	C2	C3	C4
Tasa de crecimiento (d <sup>-1</sup> )	0,310	0,340	0,321	0,347	0,250
Productividad (mg/L*d)	58,28	91,48	77,94	113,40	69,13

Los resultados de este experimento permitieron verificar que el carbono fue un factor limitante en los ensayos realizados en el capítulo 6.2. presentando productividades significativamente mayores en los ensayos con adición de carbono a 0,5 g/L que en los ensayos en dicho capítulo, dichos resultados están acorde a los resultados reportados en la Cuadro 1, donde se observa que los medios de cultivo con una cantidad considerable de carbono presentan las más altas tasas de crecimiento y productividades.

En comparación con los resultados obtenidos en las aguas residuales (ver Cuadro 6), presentaron diferencias significativas con los tratamientos C1, C3 y C4 en relación a las tasas de crecimiento y con los tratamientos C2, C3 y C4 en relación a las productividades. Siendo mayores las obtenidas en los ensayos con carbonato de sodio y glucosa. Lo cual está acorde a lo esperado debido a que al comparar la caracterización del agua residual con la del medio de cultivo con adición de carbono se observa una concentración mucho mayor de nutrientes tanto orgánicos como inorgánicos en el medio de cultivo sintético enriquecido, por lo cual en éste es mucho menos probable que existan factores limitantes en su crecimiento.

En el presente ensayo se demostró que se puede lograr un mejor crecimiento de la microalga en un medio sintético enriquecido que en las aguas residuales de la UAO, siendo la concentración de nutrientes la principal razón para este hecho, ya que las condiciones de temperatura y pH del agua residual son muy similares a la del medio sintético. Sin embargo, el uso de medios de cultivo sintéticos enriquecidos acarrearían mayores costos de mantenimiento en el caso de implementarse cultivos a gran escala.

## 7. CONCLUSIONES

La sustitución de las aguas residuales domésticas de la UAO como un medio natural para el cultivo de la cepa *Chlorella sp.* (CM1) con fines de producción de grandes cantidades de biomasa se postula como muy posible. Cabe resaltar que las condiciones en las que se evaluó esta hipótesis, fue bajo condiciones asépticas, para esto fue necesario el auto clavado del agua residual, dicho tratamiento sin lugar a dudas modificó las condiciones originales del agua residual, cambiando muy posiblemente incluso su composición química, razón por la cual sería interesante observar el comportamiento de la microalga bajo condiciones no asépticas.

Se logró cultivar la microalga *Chlorella sp.* en las aguas residuales domésticas de la UAO, presentando tasas de crecimiento mayores a las obtenidas en dos medios sintéticos formulados para esta, siendo el carbono y el amoníaco los dos posibles principales estimulantes del crecimiento de la microalga en el agua residual, nutrientes que normalmente no se incluyen dentro de los medios de cultivo sintéticos, muy probablemente debido a su volatilidad en el caso del amoníaco. La mayor tasa de crecimiento y productividad se obtuvo en el agua residual auto clavada ( $0,295\text{ d}^{-1}$  y  $90,58\text{ mg/L}\cdot\text{d}$ , respectivamente), sin presentar una variación significativa en comparación con el agua residual auto clavada y filtrada, siendo este un resultado importante ya que a gran escala uno de los principales factores limitantes en el crecimiento de las microalgas es la distribución uniforme de la luz. Al hacer innecesario un proceso de filtración adicional al tratamiento convencional de las aguas residuales para el crecimiento adecuado de las microalgas se reduciría notablemente los costos de implementación de tratamientos avanzados con microalgas.

La implementación de la cepa *Chlorella sp.* como un tratamiento avanzado para aguas residuales domésticas, en el cual se remueva una importante cantidad de nitrato se demostró muy posible, debido a que se alcanzó una remoción mayor al 50% en tres días de tratamiento manejando un inóculo relativamente pequeño y bajo condiciones de déficit de nutrientes. La remoción de fósforo muy posiblemente se presentó simultáneamente debido a que para el crecimiento de la microalga este nutriente es de vital importancia. Por otra parte, no se logró observar una remoción apreciable de DQO, por el contrario, se vio un aumento de esta tras el sexto día de tratamiento. Esto muy posiblemente obedeció a las condiciones del efluente, el cual presentó una DQO muy baja (por debajo de los  $40\text{ mg/L}$ ) implicando esto que la materia orgánica presente en el agua residual se encontraba estabilizada. Este hecho es muy probable ya que debido al cese de actividades en la Universidad la PTAR se encontraba detenida, lo cual implicó un TRH mucho mayor al normal en el tratamiento con lodos activados, permitiendo



que las bacterias contenidas en este degradaran más materia orgánica de la que normalmente degradan. El aumento de la DQO esencialmente se debió muy posiblemente a la expulsión de azúcares o compuestos orgánicos al medio.

El agua residual doméstica tratada de la UAO demostró tener un bajo potencial para el crecimiento autotrófico de la microalga *Chlorella sp.* al contener una baja cantidad de macro nutrientes como el nitrógeno y el fósforo. Sin embargo, el crecimiento de estos microorganismos bajo dichas condiciones es bien sabido se realiza a través del metabolismo mixotrófico el cual es posible efectuar debido a la presencia de materia orgánica disuelta, siendo además una vía de crecimiento mucho más práctica al no depender de la energía lumínica. En este orden de ideas, los principales factores limitantes en el agua residual son el carbono orgánico, nitrógeno y el fósforo los cuales, en la medida que avancen por el tren de tratamiento presentarán concentraciones más bajas.

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos del capítulo 6.4.1. se comprobó que la adición de una fuente de carbono ya sea orgánica o inorgánica, mejora de forma considerable los rendimientos en producción de biomasa, observándose una relación directa entre ambos parámetros. Es decir, a mayor concentración de carbono mayor productividad de biomasa. Sin embargo, es bien sabido que la adición de carbono inorgánico en cantidades excesivas, ya sea en forma gaseosa como  $\text{CO}_2$  o disolviendo sales carbonatadas en el medio, puede ocasionar una disminución en las productividades, debido a la disminución en el pH para el caso del  $\text{CO}_2$  y debido al estrés salino en el caso de las sales carbonatadas. También se verificó que estimular el metabolismo mixotrófico de las microalgas mejora en gran medida la producción de biomasa, obteniendo de esta forma la productividad más alta en el presente proyecto bajo la condición de mayor concentración de glucosa, en este orden de ideas, la adición de carbono orgánico es más eficiente en la generación de biomasa que el carbono inorgánico, presentando además la ventaja de no depender de la energía lumínica.

Finalmente cabe resaltar que todos los ensayos realizados estuvieron bajo condiciones de baja iluminación en relación con otros estudios, debido a las limitaciones de equipos en el laboratorio, además de variación de temperatura, lo cual muy posiblemente generó ruido en los resultados. Pudiéndose de esta forma presentar mayores diferencias y mayores productividades bajo las mismas condiciones pero aumentando la iluminación.

## 8. RECOMENDACIONES

El auto clavado del agua residual es un paso indispensable para su estudio en condiciones asépticas, sin embargo, es un tratamiento el cual muy posiblemente cambie sus condiciones originales, cambiando incluso su composición química disminuyendo de esta manera la concentración de nutrientes importantes como el nitrógeno en forma de amoníaco, razón por la cual se recomienda su estudio bajo condiciones no asépticas. Adicionalmente bajo dichas condiciones sería interesante observar la acción desinfectante de las microalgas al aumentar el pH.

Por otro lado, se recomienda realizar estudios con la microalga en reactores semi-continuos o continuos utilizando el agua residual, ya que son los sistemas más ampliamente usados en el tratamiento de estas y son pocos los estudios reportados bajo estas condiciones. Esto implica un nivel mayor de complejidad en el montaje de experimentos, sin embargo es importante observar el comportamiento de la microalga bajo dichas condiciones si se pretende escalar su cultivo. Cabe resaltar que al realizar cultivos continuos o semi-continuos es menos probable que se presente una inhibición en el crecimiento de la microalga por la acumulación de sustancias inhibitorias.

Debido que la concentración de materia orgánica disuelta en las aguas residuales domésticas presenta una relación directa con la productividad de biomasa, se recomienda evaluar el crecimiento de la microalga *Chorella* sp. utilizando como medio el agua residual de otros puntos del tren de tratamiento donde presente una mayor carga de DQO o DBO, ya sea bajo condiciones asépticas o no asépticas. En este orden de ideas se recomienda evaluar el crecimiento de la microalga en aguas residuales con altos contenidos de glucosa debido a la alta afinidad que la microalga *Chlorella* tiene por dicho compuesto.

Realizar la caracterización química de la microalga cultivada en aguas residuales sería el siguiente paso a realizar. Para de esta forma observar los posibles productos a obtener con la biomasa producida en dichas aguas.

De igual forma sería interesante observar el comportamiento de la microalga con adición de carbono orgánico e inorgánico simultáneamente para observar si es posible obtener mayores productividades. En este sentido, la adición de carbono inorgánico a las aguas residuales podría mejorar las productividades y simultáneamente aumentar la remoción de nutrientes y otros parámetros.

Finalmente con el objetivo de verificar la remoción de DQO de las aguas residuales domésticas por parte de la microalga sería importante realizar su cultivo utilizando como medio el agua residual en un periodo en el cual se presente una alta carga contaminante.

## BIBLIOGRAFIA

ABDEL-RAOUF, N.; AL-HOMAIAN, A. y IBRAHEEM, I. Microalgae and wastewater treatment. En: *Saudi Journal of Biological Sciences*, Mayo del 2012, No 19, p. 270.

AKERSTROM, A., *et al.* Biomass production and nutrient removal by *Chlorella* sp. as affected by sludge liquor concentration. En: *Journal of environmental management*, Mayo de 2014, no. 144, p. 122-123.

ANTONIO, N., *et al.* Densidad celular y acumulación de lípidos en cultivos libres de *Chlorella vulgaris* y *Neochloris oleoabundans* a diferentes concentraciones de nitrógeno y carbonato de sodio. En: *Unacar Tecnociencia*, Diciembre de 2010, No 5, p. 66.

ARBIB, Z., *et al.* Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: wastewater tertiary treatment, CO<sub>2</sub> bio-fixation and low cost biofuels production. En: *Water research*, Octubre de 2013, No 49. p. 468.

CAI, T.; PARK, S. & LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. En: *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Noviembre de 2012, No 19, p. 367.

CHRISTENSON, L., y SIMS, R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. En: *Biotechnology advances*, Junio de 2011, No 29, p. 699.

GIKONYO, B. *Advances in Biofuel Production*. Ed. Apple Academic Press. Oakville. Canadá. 2014, p. 2.

GOMEZ, Liliana. Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos. En: *Revista cubana de química*, Junio de 2007, vol. 19, p. 3-4.

HACH COMPANY. *Manual de Análisis de Agua*. 2da Edición. Loveland, Colorado. EEUU. 2000, p. 209.

HULATT, C. y THOMAS, D. Productivity, carbon dioxide uptake and net energy return of microalgal bubble column photobioreactors. En: *Bioresourcetchnology*, Marzo de 2011, No 102, p. 5778.

IDROBO, G., *et al.* Biomasa de microalga nativa colombiana para biocombustibles con balance de CO<sub>2</sub> y huella hídrica positivos. En: *V Congresos Internacional De Ciencia y Tecnología De los Biocombustibles*, Mayo de 2012, p. 151.

IDROBO, G.; FLOREZ, L. y LOPEZ, J. Aumento de lípidos totales mediante depleción de nitrógeno en microalgas: camino errado para el aumento de la productividad lipídica para biodiesel. En: V *Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Biocombustibles*, Mayo de 2012, p. 169.

IPCC. Cambio Climático 2007: Informe de Síntesis. Ginebra. Suiza. 2007, p. 5.  
Kumar, A., Ergas, S., Yuang, X., Sahu, A., Zhang, Q., Dewulf, J., Malcata, F. X., et al. Enhanced CO<sub>2</sub> fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. En: *Trends in biotechnology*, 2010, No 28, p. 378.

LI, C., et al. Novel bioconversions of municipal effluent and CO<sub>2</sub> into protein riched *Chlorella vulgaris* biomass. En: *Bioresource technology*, Diciembre de 2012, no. 132, p. 174.

Li, H., et al. Conversion efficiency and oil quality of low-lipid high-protein and high-lipid low-protein microalgae via hydrothermal liquefaction. En: *Bioresource Technology*, Diciembre de 2013, No 154, p. 322.

LIZZUL, A. M., et al. Combined remediation and lipid production using *Chlorella sorokiniana* grown on wastewater and exhaust gases. En: *Bioresource technology*, Octubre de 2013, no. 151, p. 17.

MAITY, J., et al. Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives - A mini review. En: *Energy*, Enero de 2014, p. 5-6.

METCALF & EDDY. Ingeniería de aguas residuales. 3 ed. España: McGraw-Hill, 1995. Volumen 1.

MUTANDA, T., et al. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. En: *Bioresource technology*, Julio de 2011, No 102, p. 57.

PECCIA, J., et al. Nitrogen supply is an important driver of sustainable microalgae biofuel production. En: *Trends in biotechnology*, Marzo de 2013, No 31, p. 135-137.

PHUKAN, M. M., et al. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. En: *Applied Energy*, Enero de 2011, No 88, p. 3307.

PRIYADARSHANI, I. & RATH, B. Commercial and industrial applications of microalgae – A review. En: *Journal of Algal Biomass Utilization*, Marzo de 2012, no. 3, p. 89.

RAMOS-SUARÉZ, J. y CARRERAS, N. Use of microalgae for biogas production. En: Chemical Engineering Journal. Diciembre de 2013, No 242, p. 86.

RASOUL-AMINI, S., *et al.* Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae free cells in bath culture system. En: *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Septiembre de 2013, No 3, p. 128.

RASOUL-AMINI, S., *et al.* Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae free cells in bath culture system. En: *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Septiembre de 2013, no. 3, p. 128.

RAZZAK, S., *et al.* Integrated CO<sub>2</sub> capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing - A review. En: *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Agosto de 2013, no. 27, p. 623-624.

RICHMOND, A. Handbook of Microalgal culture. Ed. Blackwell Science. Carlton. Australia. 2004, p. 102-106.

ROMERO, M. Proceso de Eutrofización de afluentes y su prevención por medio de tratamiento de efluentes. En: *Revista de Ingeniería Primero*, Junio de 2010, No 17, p. 66.

ROMO PIÑERA, Abril. Manual para el cultivo de microalgas. Trabajo de grado Biólogo Marino. La Paz: Universidad Autónoma de baja California Sur. Departamento de Biología Marina. Diciembre de 2002. 65 p. (p. 3).

SAMORÍ, G., *et al.* Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: part I. En: *Water research*, Noviembre de 2012, no. 47, p. 791-792.

SHI, J.; PODOLA, B. & MELKONIAN, M. Application of a prototype-scale Twin-Layer photobioreactor for effective N and P removal from different process stages of municipal wastewater by immobilized microalgae. En: *Bioresource technology*, Diciembre de 2013, no. 154, p. 260-261.

SPOLAORE, P., *et al.* Commercial applications of microalgae. En: *Journal of bioscience and bioengineering*, Julio de 2005, vol. 101, no. 2, p. 87.

WANG, L., *et al.* Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. En: *Applied biochemistry and biotechnology*, Noviembre de 2009, No 162.

WANG, L., *et al.* Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. En: Applied biochemistry and biotechnology, Noviembre de 2009, no. 162.